

**I.**

# Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR

R Sepp, I Szabó, H Uda, H Sakamoto

## Abstract

**Aims**—To evaluate the ability of four rapid DNA extraction methods to provide DNA for the polymerase chain reaction (PCR) from routinely fixed, paraffin wax embedded archival tissues.

**Methods**—Eighteen blocks of various tissues, 18 blocks of cervical cancer specimens, and nine blocks of B cell lymphomas were investigated. Both normal and biopsy specimen sized tissues were studied. DNA was extracted using four methods: boiling for 20 minutes in distilled water; boiling for 20 minutes in 5% Chelex-100 resin solution; 3-hour proteinase K digestion; and 3-hour proteinase K digestion, followed by boiling in 5% Chelex-100. Different exons of the p53 gene, human papillomavirus type 16 (HPV 16) sequence, and immunoglobulin heavy chain (IgH) gene rearrangement were amplified from the extracts.

**Results**—The Chelex boiling, proteinase K digestion, and proteinase K digestion-Chelex boiling methods produced DNA suitable for amplification in all of the 45 samples. Boiling in water yielded insufficient template for the PCR in three of the 45 cases (7%), and in six of 42 positive cases (14%) much fainter bands were observed, mostly when the processed material was either biopsy specimen sized or a B cell lymphoma sample. Fragments of the p53 gene were successfully amplified up to 408 base pairs in water boiled extracts, up to 647 in Chelex boiled prepartes, and up to 984 in proteinase K digested and proteinase K digested-Chelex boiled samples, although with decreased sensitivity in the last case. All of the templates were reusable after 3 months of storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Conclusions**—Chelex boiling, proteinase K digestion, and proteinase K digestion followed by Chelex boiling produce suitable templates for the PCR from a large variety of paraffin wax embedded tissues. As the simple 20 minute boiling method in 5% Chelex-100 solution requires minimal manipulation and time, it could be useful, especially in the routine processing of large amounts of material.

specific nucleic acid sequences.<sup>1</sup> The technology provides a powerful means for the rapid detection of infections, particularly those by viral pathogens,<sup>2-5</sup> of gene rearrangements in lymphoproliferative disorders,<sup>6,7</sup> and of inherited diseases.<sup>8</sup> Furthermore, the technique can serve as an initial step for PCR based investigations.

An attractive feature of PCR is that, unlike other molecular biological procedures, high molecular weight DNA is not required for successful amplification. As minute quantities of degraded DNA can also serve as the substrate for the reaction, the method is ideally suited to a template extracted from formalin fixed, paraffin wax embedded archival material. The combined advantages of exquisite sensitivity and the ability to use routinely processed materials allow large scale, retrospective studies to be carried out.

The most widespread protocols for DNA extraction from formalin fixed, paraffin embedded tissues utilise shorter or longer proteolytic treatment—ranging from three hours to several days—with or without additional organic solvent purification and ethanol precipitation.<sup>9-13</sup> An alternative procedure for tissue processing for PCR involves lysing cells by boiling in distilled water<sup>3,14,15</sup> or in a solution containing a chelating resin.<sup>4,5,16</sup> Other methods such as sodium dodecyl sulphate (SDS) incubation<sup>12,15</sup> or sonication<sup>17</sup> have also been described.

For the large scale, routine processing of archival material, DNA extraction should be simple and rapid, with no influence on the success of the PCR. Moreover, as few steps as possible should be involved to minimise the possibility of contamination. The laborious and hazardous phenol-chloroform extraction should be particularly avoided.

Previous reports have focused mainly on quantitative issues comparing DNA obtained from fresh or fixed tissues,<sup>5,12,17</sup> and have examined applicable methods separately<sup>14,16</sup> or have compared them in the amplification of only a few similar target sequences.<sup>4,12</sup>

We performed a qualitative study, comparing several reported rapid DNA extraction procedures which take less than 4 hours. The ability of these methods to provide DNA suitable for the PCR was investigated. For a more precise comparison, various sets of primers were chosen to amplify a single copy human gene, a viral sequence, and a rearranged immunoglobulin gene. Several practical aspects of the PCR were also examined, taking into consideration the size of the

2nd Department of Pathology, Kagawa Medical School, 1750-1 Miki-cho, Kita-gun, 761-07 Kagawa, Japan  
R Sepp  
H Uda  
H Sakamoto

2nd Department of Surgery  
I Szabó

Correspondence to:  
H Sakamoto

Accepted for publication  
3 November 1993

(J Clin Pathol 1994;47:318-323)

The polymerase chain reaction (PCR) is a method for the in vitro amplification of



processed tissue, previous dewaxing, target sequence length, and the reuse of extracts.

## Methods

Blocks of formalin fixed, paraffin wax embedded archival tissues were selected from the files of the Department of Pathology, Kagawa Medical School, Japan. Normal sized (average surface dimensions 16 × 18 mm) and biopsy specimen sized (average surface dimensions 1.7 × 2 mm) tissue samples were collected and divided into the following groups:

(1) Twelve blocks of normal sized and six blocks of biopsy specimen sized material, randomly chosen from various tissues; they represented neoplastic, inflammatory, or hyperplastic processes of the skin, soft tissue, tonsils, oesophagus, duodenum, colon, pancreas, lung, kidney, urinary bladder, meninges, ovary, cervix, normal placenta, and endometrium

(2) twelve blocks of normal sized cervical cancer samples and an additional six blocks of cervical biopsy specimens (diagnosed as cancer or severe dysplasia), known to harbour human papilloma virus type 16 (HPV 16) DNA by the authors' previous PCR assays

(3) six blocks of normal sized non-Hodgkin's B cell lymphoma samples (B-NHL) and an additional three blocks of B-NHL biopsy specimens, known to have detectable immunoglobulin heavy chain (IgH) gene rearrangement according to the authors' previous PCR results.

The material was processed between 1988 and 1993. Fixation was in neutral formalin, and the fixation time varied from 24 to 48 hours. Processing was done by standard methods: dehydration in graded alcohols; clearing in xylene; and embedding in paraffin wax.

## DNA EXTRACTION

From normal sized tissues a single 5 µm section (average collected volume 1.44 mm<sup>3</sup>) and from biopsy specimen sized tissues a single 10 µm section (average collected volume 0.034 mm<sup>3</sup>) were cut and processed according to the following four methods (Methods A–D).

## Method A

The section was resuspended in 100 µl distilled water (50 µl for biopsy specimen sized material), with or without pretreatment, and was boiled for 20 minutes (modified from the method of Lench *et al*<sup>15</sup>). Pretreatment, if performed, consisted of dewaxing by two washes in xylene at 60°C for 20 minutes, rehydration in absolute ethanol, and desiccation.

## Method B

This was similar to Method A, but the section was resuspended in 5% Chelex-100 resin solution (Bio Rad Laboratories, Hercules, California, USA) and was boiled for 20 minutes.<sup>18</sup>

## Method C

After dewaxing and rehydration, the tissue section was resuspended in 100 µl (50 µl for biopsy specimen sized material) of digestion buffer (50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM TRIS-HCl, 0.5% TWEEN 20, pH 9 at 25°C) containing 200 µg/ml proteinase K (Merck, Darmstadt, Germany) and was incubated at 55°C for 3 hours (or at 37°C overnight).<sup>19</sup> The proteinase K was inactivated by boiling for eight minutes.

## Method D

This was similar to Method C, but after digestion Chelex-100 was added to a final concentration of 5%, and the mixture was boiled for eight minutes (modified from the method of Gill *et al*<sup>20</sup>).

After boiling, all the tubes were chilled on ice, and were centrifuged for five minutes at 18 000 × *g*. An aliquot of 5 µl of the supernatant (10 µl for biopsy specimen sized tissue) was used as the template.

## OLIGONUCLEOTIDE PRIMERS

The sequences, target regions, and other characteristics of the primers are shown in table 1. Three types of primer set were used: one for different exons of the p53 gene as a normal single copy human gene, on the randomly chosen tissues; a second type for the open reading frame region E6 of HPV 16 on cervical samples; and a third type for IgH gene rearrangement on B cell lymphomas. Oligonucleotides were synthesised on a

Table 1 Oligonucleotide primers used in the study

Primer	Sequence (5'–3')	Target region	Size of PCR product (base pairs)	Source
E81	CCTATCCTGAGTAGTGGTAATCTAC	p53 gene, exon 8	166	Miller <i>et al</i> <sup>21</sup>
E82	GTCCTGCTTGCTTACCTCGCTTAGT			
E71	CTCCTAGGTTGGCTCTGACTGT	p53 gene, exon 7	131	
E72	CAAGTGGCTCCTGACCTGGA			
E61	CACCTGATTGCTCTTAGGTCTGGC	p53 gene, exon 6	144	
E62	AGTTGCAAACAGACCTCAGGCG			
E51	TTCTCTCTTCCTGCAGTAC	p53 gene, exon 5	214	
E52	GCCCCAGCTGCTCACCATCG			
E41	AAAACCTACCAGGGCAGCTAC	p53 gene, exon 4	99	
E42	CTCAGGGCAACTGACCGTG			
H1	ATTAGTGAGTATAGACATTA	HPV 16, ORF E6	110	Shibata <i>et al</i> <sup>3</sup>
H2	GGCTTTTGACAGTTAATACA			
Fr3A	ACACGGC(C/T) (G/C) TGTATTACTGT	IgH gene, V region IgH gene, J region	80–120 —	Wan <i>et al</i> <sup>6</sup>
LJH	TGAGGAGACGGTGACC			
VLJH	GTGACCAGGGT(A/G/C/T)CCTTGCCCCAG			

ORF = open reading frame; V region = variable region; J region = joining region



Cyclone Plus automated DNA synthesiser (Millipore, Bedford, Massachusetts, USA).

**PCR**  
The PCR was carried out in a Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, Connecticut, USA). The reaction mixture (in 50 µl or 25 µl total volume) contained 10–20 pmol of primers, 1 × PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM TRIS-HCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9 at 25°C), 0.2 mM each of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP, 0.625–1.25 U of *Taq* polymerase (Pharmacia Biotech, Milwaukee, Wisconsin, USA), and the template. The reaction mixture was overlaid with a drop of light mineral oil (Sigma, St Louis, Missouri, USA).

Each PCR cycle consisted of a denaturation step at 94°C for 30 seconds, primer annealing at 60°C (55°C for H1 and H2 primers) for 30 seconds, and extension at 72°C for 1 minute. An initial denaturation step was performed at 94°C for 2 minutes, and in the final cycle the extension step was elongated to 5 minutes at 72°C. Samples were amplified through 35 (for normal sized samples) or 40 cycles (biopsy specimen sized samples).

For biopsy specimen sized B cell lymphoma samples, seminested PCR was performed: a first round of 30 cycles with primers Fr3A and LJH; and a second round of 35 cycles with Fr3A and VLJH, with 1 µl of the product of the first round of the PCR as the template.<sup>6</sup>

In all runs positive and negative controls were included. The positive and negative controls were as follows: HPV 16 positive DNA (Genemed, San Francisco, California, USA) and DNA extracted from human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) carrier cell line, respectively, for the HPV 16 PCR; high molecular weight DNA extracted from fresh frozen human lung and distilled water, respectively, for the p53 PCR; and DNA extracted from paraffin wax embedded B cell and T cell lymphoma samples, respectively, for the IgH PCR.

Sterile materials were used throughout, with strict precautions to avoid contamination or product carryover.<sup>22</sup> DNA extraction, the PCR, and electrophoresis were performed in separate laboratories.

Table 2 PCR results on different materials prepared by Methods A–D (numbers shown are positive cases/total cases)

Material	Method			
	A	B	C	D
Normal sized:				
Various samples	12/12	12/12	12/12	12/12
Cervix samples	12/12	12/12	12/12	12/12
B cell lymphoma samples	5*/6	6/6	6/6	6/6
Biopsy specimen sized:				
Various samples	4†/6	6/6	6/6	6/6
Cervix samples	6/6	6/6	6/6	6/6
B cell lymphoma samples	3/3	3/3	3/3	3/3
Total	42‡/45	45/45	45/45	45/45

\* Fainter bands in four cases  
† Fainter bands in two cases  
‡ Fainter bands in six cases

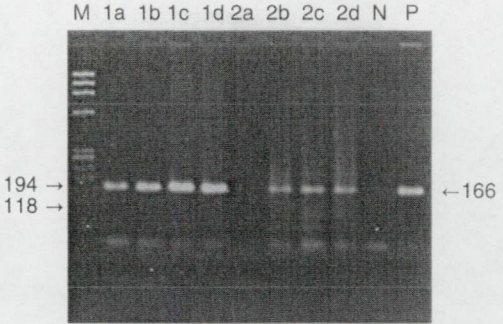


Figure 1 3% agarose electrophoresis gel of the PCR products, showing amplification of a 166 base pair fragment of exon 8 of the p53 gene from DNA extracted from normal and biopsy specimen sized paraffin wax embedded tissue by different methods. M:  $\phi$ X 174 DNA *Hae* III digest. 1a–d: normal sized tissue sample of colonic adenocarcinoma processed by Methods A (1a), B (1b), C (1c), and D (1d). 2a–d: biopsy specimen of duodenal polyp processed by Methods A (2a), B (2b), C (2c), and D (2d). N: negative control (distilled water instead of template). P: positive control (high molecular weight DNA as template, extracted from fresh frozen human lung). The sizes of the molecular weight marker and the specific band (in base pairs) are shown to the left and right, respectively.

GEL ANALYSIS

The quality of the template DNA was determined by running samples on 1% agarose gel (Wako Chemicals, Osaka, Japan) stained by ethidium bromide. Amplifications were analysed by electrophoresis of a 10 µl aliquot through 3% NuSieve GTG agarose (FMC Bioproducts, Rockland, Maine, USA), followed by ethidium bromide staining visualised by an ultraviolet light transilluminator. Bands of appropriate size were identified by comparison with DNA markers of known size.

Results

The overall results obtained by the PCR using the different primer sets are shown in table 2.

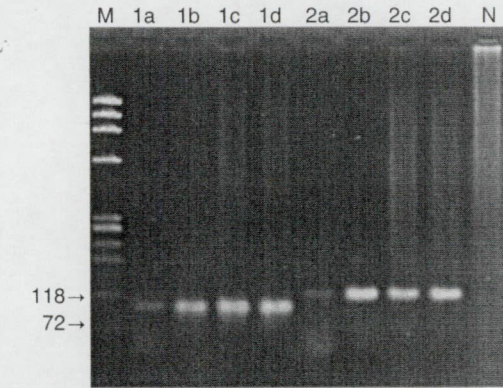


Figure 2 3% agarose electrophoresis gel of the PCR products, showing amplification of an ~100–120 base pair fragment of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene from DNA extracted from two normal sized B cell lymphoma samples by different methods. M:  $\phi$ X 174 DNA *Hae* III digest. 1a–d: parotid B cell lymphoma processed by Methods A (1a), B (1b), C (1c), and D (1d). 2a–d: intestinal B cell lymphoma processed by Methods A (2a), B (2b), C (2c), and D (2d). N: negative control (DNA extracted from a T cell lymphoma sample as the template). The sizes of the molecular weight marker bands (in base pairs) are shown to the left.



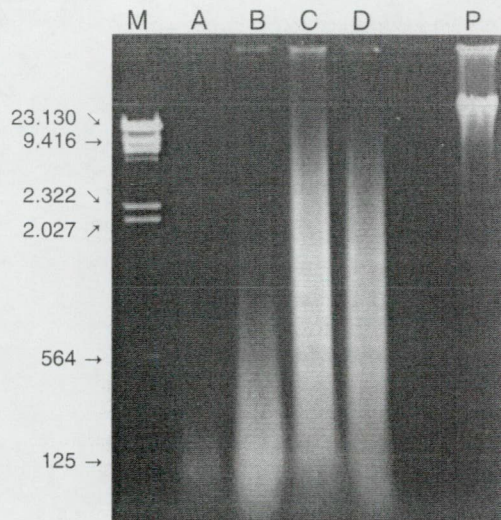


Figure 3 1% agarose electrophoresis gel of DNA extracted from a normal sized oesophageal carcinoma sample by different methods. M:  $\lambda$  DNA Hind III digest; (A): boiled in distilled water (Method A); (B): boiled in 5% Chelex solution (Method B); (C): proteinase K digested (Method C); (D): proteinase K digested and boiled in 5% Chelex solution (Method D); P: positive control (high molecular weight DNA extracted from fresh frozen human lung). The sizes of the molecular weight marker bands (in base pairs) are shown to the left.

#### P53 GENE AMPLIFICATION IN VARIOUS RANDOMLY CHOSEN TISSUES

A 166 base pair fragment of exon 8 or a 99 base pair fragment of exon 4 of the p53 gene was amplified. All of the templates prepared from normal sized tissues by different methods produced a single specific amplification band with the same intensity (fig 1, lanes 1a-d). However, two of the biopsy specimen sized samples (33% of the specimens) prepared by the water boiling method (Method A) failed to show the amplification, and in two other cases (50% of the successful amplifications) the bands were much fainter. Biopsy samples prepared by Chelex boiling (Method

B), proteinase K digestion (Method C) and proteinase K digestion-Chelex boiling (Method D) provided uniformly intense bands (fig 1, lanes 2a-d).

#### HPV 16 AMPLIFICATION IN CERVICAL SAMPLES

A 110 base pair fragment of the open reading frame region E6 of HPV 16 was amplified. All of the samples prepared by the different methods from both normal and biopsy specimen sized tissues were successfully amplified (data not shown).

#### IMMUNOGLOBULIN GENE REARRANGEMENT

##### AMPLIFICATION IN B CELL LYMPHOMA SAMPLES

Depending on the given rearrangement of particular clones of B cell lymphomas, an 80–120 base pair fragment was amplified. One normal sized lymphoma specimen (17% of the normal sized B cell non-Hodgkin's lymphomas) prepared by the water boiling method failed to reveal amplification and in four other cases (80% of the successful amplifications) much fainter bands were observed. DNA extracted by the other three methods produced intense bands of appropriate size in all cases (fig 2). The three biopsy specimens investigated by seminested PCR showed similar strong bands, regardless of the method used for extraction.

#### ANALYSIS OF PREVIOUS DEWAXING

To reduce further the number of steps involved in the extraction, the dewaxing and rehydration steps were omitted from the water boiling and Chelex boiling protocols. No differences were found in the successful amplifications using these extracts (data not shown).

#### ANALYSIS OF TEMPLATE QUALITY

The DNA extracted by the different methods was analysed on 1% agarose gel. There was evidence of extreme DNA degradation in templates prepared by water boiling (Method A), with the bulk between 100 and 200 base pairs. The DNA obtained by Chelex boiling (Method B) was better preserved, with a distribution in the 100–600 base pairs range. The proteinase K digestion methods (Methods C and D) produced DNA of increased molecular weight with a range from 100 to over 10 000 base pairs, with the bulk between 100 and 4000 base pairs (fig 3).

#### ANALYSIS OF THE TARGET SEQUENCE LENGTH

Combining forward and reverse primers, homologous to consecutive exons of the p53 gene, amplification products of gradually increasing length were able to be created. Primers E51 and E52 (flanking exon 5) amplify a target of 214 base pairs, while primers E51 and E62 (flanking exon 5 and 6), E71 and E82 (flanking exon 7 and 8) and E61 and E72 (flanking exon 6 and 7) amplify regions of 408, 647, and 983 base pairs, respectively. Two normal sized samples were analysed by this primer network.

Proteinase K digested and proteinase K digested-Chelex boiled templates were successfully amplified up to 983 base pairs (data

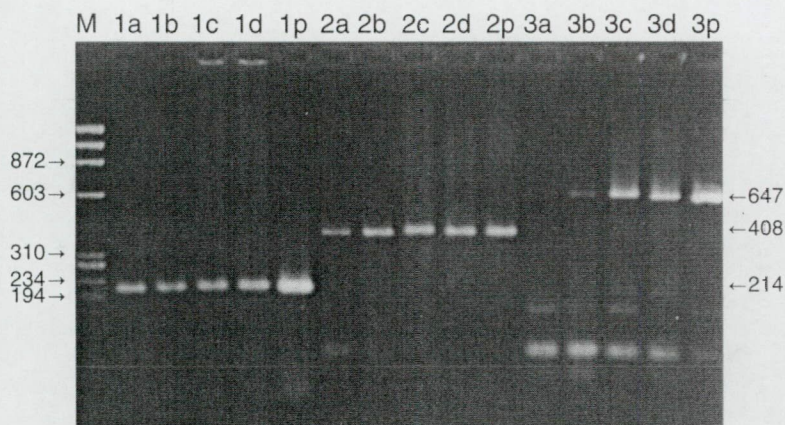


Figure 4 2.5% agarose electrophoresis gel of PCR products showing amplification of exon 5, exon 5–6, and exon 7–8 of the p53 gene from DNA extracted from a normal sized cervical cancer sample by different methods. M:  $\phi$ X 174 DNA Hae III digest; 1a–d: amplification of 214 base pair fragment from extracts prepared by Method A (1a), B (1b), C (1c) and D (1d); 2a–d: amplification of 408 base pair fragment from extracts prepared by Method A (2a), B (2b), C (2c) and D (2d); 3a–d: amplification of 647 base pair fragment from extracts prepared by Method A (3a), B (3b), C (3c) and D (3d); 1p, 2p, 3p: positive controls (high molecular weight DNA as template, extracted from fresh frozen human lung). The sizes of the molecular weight marker and the specific bands (in base pairs) are shown to the left and right, respectively.



not shown), although with an accumulation of non-specific products owing to uncompleted amplifications. Chelex boiled material showed a strong signal for 214 and 408 base pair targets, and still produced a weak band on the 647 base pair target. Water boiled material was successfully amplified on the 214 and 408 base pair targets only (fig 4).

#### ANALYSIS OF THE REUSE OF TEMPLATES

After three months of storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ , two samples from each group prepared by the four methods were successfully reamplified for their specific targets. However, 408 base pair targets produced weaker bands than freshly prepared samples, and amplification for the 647 base pair fragment was successful only in proteinase K digested and proteinase K digested-Chelex boiled samples (data not shown).

#### Discussion

Although formalin fixed tissues can also provide high molecular weight DNA, suitable for complex molecular biological investigations,<sup>9,11</sup> the procedure requires lengthy digestion and purification steps, which would be difficult to perform on a large scale. The major attraction of the PCR, for research and diagnostic purposes in pathology, is its ability to work on poor quality DNA samples obtained by simple methods of extraction.

Four different techniques of rapid DNA extraction, from paraffin wax embedded tissues, were examined, from which PCR results can be obtained within 4–8 hours. DNA produced by the simplest water boiling method failed to be amplified for specific sequences in 7% of the total cases. In addition, in 14% of the positive samples the signal yielded was much weaker than in cases using other methods. Several investigators have also reported a variable degree of failure using this technique.<sup>4,14,16</sup> It seems likely that the cause of failure is the absence of a detectable amount of the target DNA. Theoretically, the amount of the released target DNA can be small if the size of the processed tissue is small (a biopsy specimen) or if only a portion of the processed material carries the target sequence (monoclonal B cells with a rearranged IgH gene). Indeed, the authors were able to amplify the p53 gene fragment from the water boiled extracts in all of the normal sized tissues but in only 66% of the biopsy specimen sized samples. Furthermore, in half of the latter successful cases fainter bands were observed. The presumed small population of monoclonal B cells also failed to be amplified in 17% of the samples, and yielded fainter bands in 80% of the positive cases, examined on normal sized B cell non-Hodgkin's lymphoma tissues. However, all of the biopsy specimen sized tissues were amplified successfully, probably due to the more sensitive semi-nested PCR, although it is also possible that the clonal population was more numerous in these cases. When 1/2, 1/4, 1/8, and 1/16 subdivisions of the same normal sized lymphoma

tissue were processed, the samples prepared by the water boiling method produced clearly weaker bands on the 1/8 and 1/16 portions (data not shown). In contrast, the authors did not experience any difference when amplifying HPV 16 on normal or biopsy specimen sized cervical samples, where the target number seems to be above the limit that can cause discernible differences (cervical cancer cells may contain one to 50 copies of HPV per cell).<sup>23</sup>

Preparing the tissue samples by boiling in Chelex-100 solution produced enough DNA to be amplified at the same intensity as from those samples prepared by proteinase K based methods, regardless of the tissue type, size, or target sequences used. Chelex-100 is a chelating resin that preferentially chelates polyvalent metal ions. Sample processing by Chelex has been successfully employed for a small number of cells,<sup>18</sup> for forensic type materials,<sup>24</sup> and for paraffin wax embedded tissues.<sup>4,5,16</sup> The effect of Chelex, which prevents the degradation of DNA, is thought to be due to chelating metal ions which may act as catalysts in the breakdown of DNA at high temperatures in low ionic strength solutions.<sup>18,24</sup> Indeed, templates prepared by Chelex boiling in the present study were shown to be better preserved by electrophoretic examination than those prepared by the water boiling method (fig 3, lanes A and B). It is also possible that Chelex may bind other substances—blood derived products—which could inhibit the PCR itself.<sup>24</sup>

In the present study, 3 hour proteinase K digestion was also capable of yielding a sufficient amount of template DNA to amplify any of the targets in all of the cases. Although increasing the time of the digestion substantially improves the yield of DNA,<sup>12</sup> for routine purposes this does not seem to be essential. However, to avoid phenol-chloroform extraction and to use the supernatant fluid directly, it is advisable to apply non-ionic detergents in the digestion buffer, instead of sodium dodecyl sulphate which was reported to inhibit *Taq* polymerase.<sup>19,25</sup> In this experiment, adding Chelex to the proteinase K digested samples (Method D) proved to have no noticeable influence on the sample quality.

These results also indicate several limits regarding the size of the products which can be amplified from various extracts. Water boiled samples are extremely degraded and were found to allow amplifications up to only 400 base pair fragments in the present study. With a better preservation of the target DNA, it was possible to amplify fragments up to about 650 base pairs from Chelex boiled material and up to about 1000 base pairs from proteinase K digested material, although with compromised specificity. Nevertheless, this amplification product size is unlikely to be used for diagnostic purposes.

Dewaxing seems to have no effect on the successful release of DNA from paraffin wax embedded tissues. No difference was found when tissues were boiled with or without previous deparaffinisation, which is in



agreement with other observations.<sup>4,14</sup> Although tissues were dewaxed before proteinase K digestion, other investigators have eliminated this step without any effect on the yield or quality of DNA obtained.<sup>9,12</sup>

All extracts were reamplified for their relatively short (80–166 base pairs) specific targets, after storing them at  $-20^{\circ}\text{C}$  for three months. However, weakening in the product intensity was observed for the 408 base pair fragment, and failure to reamplify the 647 base pair fragment was noted from Chelex boiled samples. This decreased amplification ability was also reported in stored proteinase K digested samples, and is likely to be due to degradation or breaking of the DNA.<sup>13</sup>

In conclusion, the simplest water boiling method may fail to produce a sufficient quantity and quality of template from formalin fixed, paraffin wax embedded tissues, particularly when the starting material is small, the target molecules are expected to be of low copy number, or longer fragments are to be amplified. DNA prepared by Chelex boiling is of a quality which can be amplified as successfully, in all practical aspects, as that extracted by proteinase K digestion. As the procedure is simpler, requires less time and less manipulation—thus decreasing the possibility of contamination—it would be helpful for the large scale, routine treatment of paraffin wax embedded samples for the use of PCR.

R Sepp is an invited researcher from the Department of Pathology, A Szent-Györgyi University of Medicine, Szeged, Hungary. I Szabó is a scholar from the Department of Surgery, A Szent-Györgyi University of Medicine, Szeged, Hungary, and is supported by the Ministry of Education, Science and Culture of Japan. The authors are indebted to Professor Masazumi Maeda for providing p53 gene primers, and to Dr Chubun Sato for helpful discussions. They are also grateful to Sumiko Tanaka for her help in preparation of the photographs and to Dr Najma Janjua for reviewing the manuscript.

- 1 Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487–91.
- 2 Figueroa ME, Rasheed S. Molecular pathology and diagnosis of infectious diseases. *Am J Clin Pathol* 1991; 95(suppl 1):S8–21.
- 3 Shibata DK, Arnheim N, Martin WJ. Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J Exp Med* 1988;167:225–30.
- 4 Kiene P, Milde-Langosch K, Runkel M, Shulz K, Löning T. A simple and rapid technique to process formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for the detection of viruses by the polymerase chain reaction. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 1992;420:269–73.
- 5 Chen M-L, Shieh YSC, Shim K-S, Gerber MA. Comparative studies on the detection of hepatitis B virus DNA in frozen and paraffin sections by the polymerase chain reaction. *Mod Pathol* 1991;4:555–8.
- 6 Wan JH, Trainor KJ, Brisco MJ, Morley AA. Monoclonality in B cell lymphoma detected in paraffin wax embedded sections using the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 1990;43:888–90.
- 7 Ramasamy I, Brisco M, Morley A. Improved PCR method for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B cell neoplasms. *J Clin Pathol* 1992; 45:770–5.
- 8 Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. *N Engl J Med* 1987;317: 985–90.
- 9 Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;130: 118–26.
- 10 Imprim CC, Saiki RK, Erlich HA, Teplitz RL. Analysis of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by enzymatic amplification and hybridization with sequence-specific oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;142:710–16.
- 11 Dubeau L, Chandler LA, Gralow JR, Nichols PW, Jones PA. Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens. *Cancer Res* 1986;46: 2964–9.
- 12 Jackson DP, Lewis FA, Taylor GR, Boylston AW, Quirke P. Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 1990;43: 499–504.
- 13 Wright DK, Manos MM. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: Innis MA, ed. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990: 153–6.
- 14 Coates PJ, d'Ardenne AJ, Khan G, Kangro HO, Slavin G. Simplified procedures for applying the polymerase chain reaction to routinely fixed paraffin wax sections. *J Clin Pathol* 1991;44:115–18.
- 15 Lench N, Stainer P, Williamson R. Simple non-invasive method to obtain DNA for gene analysis. *Lancet* 1988; i:1356–8.
- 16 Stein A, Raoult D. A simple method for amplification of DNA from paraffin-embedded tissues. *Nucleic Acid Res* 1992;20:5237–8.
- 17 Heller MJ, Robinson RA, Burgart LJ, TenEyck CJ, Wilke WW. DNA extraction by sonication: a comparison of fresh, frozen, and paraffin-embedded tissues extracted for use in polymerase chain reaction assays. *Mod Pathol* 1992;5:203–6.
- 18 Singer-Sam J, Tanguay RL, Riggs AD. Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplifications* 1989;3:11.
- 19 Kawaski ES. Sample preparation from blood, cells, and other fluids. In: Innis MA, ed. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990: 146–52.
- 20 Gill P, Kimpton CP, Sullivan K. A rapid polymerase chain reaction method for identifying fixed specimens. *Electrophoresis* 1992;13:173–5.
- 21 Miller CW, Simon K, Aslo A, et al. p53 mutations in human lung tumors. *Cancer Res* 1992;52:1695–8.
- 22 Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989;339:237–8.
- 23 Nuovo GJ, ed. In situ hybridization. In: *PCR in situ hybridization*. New York: Raven Press, 1992:83–156.
- 24 Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 1991;10: 506–13.
- 25 Gelfand DH, White TJ. Thermostable DNA polymerases. In: Innis MA, ed. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990: 129–41.



**II.**

# Human Papillomavirus Not Found in Squamous and Large Cell Lung Carcinomas by Polymerase Chain Reaction

Ildikó Szabó, M.D.,\* Robert Sepp, M.D.,† Kembu Nakamoto, M.D., Ph.D.,\* Masazumi Maeda, M.D., Ph.D.,\* Haruhiko Sakamoto, M.D., Ph.D.,† and Hirotsugu Uda, M.D., Ph.D.†

**Background.** Human papillomavirus (HPV) has been identified not only in anogenital carcinomas, but also in malignancies of other organs, including bronchogenic carcinomas. Previous studies reporting detection of these viruses in lung cancers used mainly in situ hybridization. The authors applied the polymerase chain reaction (PCR) for investigating the occurrence of HPV in bronchial neoplasms.

**Methods.** Formalin fixed, paraffin embedded tissues of 40 squamous and 7 large cell lung cancers were examined. PCR was done with consensus primers, capable of detecting HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 52b, and 58.

**Results.** None of the 47 samples contained any of the examined HPV types.

**Conclusions.** Because the squamous and large cell cancer cases were found not to be associated with HPV infection, this study does not support the potential role of these viruses in the development of lung cancers. *Cancer* 1994; 73:2740-4.

**Key words:** papillomaviruses, lung neoplasms, polymerase chain reaction, viral oncogenesis.

More than 65 types of human papillomavirus (HPV) have been described.<sup>1</sup> A common feature of these viruses is their epitheliotropism, and depending on the

type of HPV can cause either benign or malignant mucosal and cutaneous proliferations.<sup>2</sup>

According to their potential role in the development of anogenital cancers (particularly in cervical carcinomas), HPV can be divided into high risk (e.g., HPV 16 and 18) and low risk (HPV 6 and 11) groups. Members of the former group may be involved in the promotion of carcinogenesis, and their DNA usually integrates into the host genome, whereas the latter types are found mainly in benign cervical lesions and show no integration.<sup>3,4</sup>

Recently, HPV DNA has also been detected in squamous cell mucosal malignancies apart from the anogenital region. Mainly high risk type viruses were found in carcinomas of the oral<sup>5</sup> and nasal cavity,<sup>6</sup> the male urethra,<sup>7</sup> the urinary bladder,<sup>8</sup> and the esophagus.<sup>9,10</sup>

With regard to the respiratory tract, HPV 16 was detected in laryngeal carcinomas,<sup>11</sup> and HPV 6 and 11 were found to be associated with laryngeal papillomas.<sup>12</sup> The latter, histologically benign proliferations, may spread into the inferior airways or may occur alone in the trachea and in bronchi. In addition, malignant transformation was reported in several cases where squamous cell laryngeal<sup>13</sup> and bronchial cancers<sup>14-17</sup> originated from benign airway papillomas containing HPV. Studies on lung cancers not preceded by known respiratory tract papillomas<sup>18-21</sup> also found variable degree of HPV presence, using in situ hybridization (ISH) in most of the investigations (Table 1).

In the current work, our aim was to examine the occurrence of HPV in squamous and large cell (which may also have squamous cell origin) lung neoplasms. We searched for high risk and low risk viruses applying the polymerase chain reaction (PCR).<sup>22</sup> This technique offers an accurate and rapid means of viral detection with a higher sensitivity than ISH.<sup>23</sup>

From the Second Departments of \*Surgery and †Pathology, Kagawa Medical School, Kagawa, Japan.

Ildikó Szabó is a scholar from the Department of Surgery, A. Szent-Györgyi University of Medicine, Szeged, Hungary, and was supported by the Ministry of Education, Science and Culture of Japan. Robert Sepp is an invited researcher from Department of Pathology, A. Szent-Györgyi University of Medicine, Szeged, Hungary.

Address for reprints: Ildikó Szabó, M.D., Second Department of Surgery, Kagawa Medical School, 1750-1 Miki-cho, Kita-gun, Kagawa 761-07, Japan.

Accepted for publication January 31, 1994.

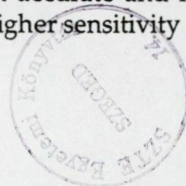




Table 1. Previous Studies on Human Papillomavirus Detection in Lung Carcinomas

Material	Method	Positive cases/ total cases (%)	HPV type found in positive cases	Source
24 various LC (SQ 9; anaplastic, 5; LA 7; AD 2; metastatic, 1)	Southern blotting	1/24 (4.2)	HPV 16 (anaplastic*)	Stremlau et al. <sup>18</sup>
131 SQ	ISH (with radioactive probes)	9/131 (6.9)	HPV 16: 7; HPV 6: 2	Syrjänen et al. <sup>19</sup>
33 SQ†	ISH (with biotinylated probes)	6/33 (18.2)	HPV 18: 2; HPV 16: 1; HPV 11: 1; HPV 6: 1; HPV 16 and 18: 1	Béjui-Thivolet et al. <sup>20</sup>
58 various LC† (SQ 20; LA 6; AD 28; SM 4)	ISH (with biotinylated probes)	7/58 (12.1)	HPV 31/33/35: 3 (SQ); HPV 16/18: 2 (SQ); HPV 6/11: 2 (SQ, LA)	Yousem et al. <sup>21</sup>

HPV: human papillomavirus; LC: lung cancer; SQ: squamous cell cancer; LA: large cell cancer; AD: adenocarcinoma; SM: small cell cancer; ISH: in situ hybridization.  
\* The possibility that this was a metastatic tumor of a cervical cancer eradicated 9 years before could not be excluded.  
† Squamous bronchial metaplasias were also investigated (data not shown).

Materials and Methods

Squamous (n = 40) and large cell (n = 7) carcinomas were examined. All were primary neoplasms resected between 1990 and 1993 at the Second Department of Surgery of Kagawa Medical School. None of the patients were known to have previous airway papillomas. One formalin fixed, paraffin embedded tissue sample of tumor from each case was investigated. The squamous cell cancers were diagnosed as well, moderately, and poorly differentiated in 5, 18, and 17 cases, respectively. Koilocytic atypia was seen in six cases (all squamous cell carcinomas) and was diagnosed by the presence of cells with pleiomorph, hyperchromatic nuclei and sharply marginated perinuclear clearing.

DNA Preparation

DNA extraction was performed as described by Jackson et al.<sup>24</sup> Briefly, an average of three 10-μm sections were cut from each block, dewaxed in xylene, and rehydrated in absolute ethanol. After desiccation, the tissue was re-suspended in 200 μl digestion buffer (100 mM sodium chloride, 10 mM Tris-hydrochloric acid, 25 mM ethylenediamine tetraacetic acid, 0.5% sodium dodecyl sulfate, pH 8.4) containing 200 μg/ml Proteinase K (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) and was incubated at 37°C for 4 days. The DNA was extracted with phenol-chloroform-isoamyl alcohol, precipitated in absolute ethanol, and redissolved in TE buffer (10 mM Tris-hydrochloric acid, 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid, pH 8). The DNA content was quantitated by a GeneQuant DNA/RNA Calculator (Pharmacia LKB, Cambridge, England). In each PCR reaction, 300 ng DNA was used as template.

Oligonucleotide Primers

Consensus primers were used designed by Fujinaga et al.<sup>25</sup> The sense primers, pU-1M and pU-31B, are located in the middle of the open reading frame E6 of the HPV genome, and the anti-sense primer, pU-2R, is located in the middle of the open reading frame E7. The primers pU-1M and pU-2R detect HPV 16, 18, 31, 33, 52b, and 58 (high risk types), whereas pU-31B and pU-2R detect HPV 6 and 11 (low risk types).  
The primers pU-1M/pU-2R amplify a fragment of 231–268 base pairs, whereas pU-31B/pU-2R yield a fragment of 228 base pairs. The primers were synthesized on a Cyclone Plus DNA synthesizer (Millipore, Bedford, MA) with the following sequences: pU-1M:5'-TGTCAAAAACCGTTGTGTCC-3'; pU-31B:5'-TGCTAATTCGGTGCTACCTG-3'; pU-2R: 5'-GAGC-TGTCGCTTAATTGCTC-3'.

PCR

The reaction mixture of 25 μl contained PCR buffer (50 mM potassium chloride, 3 mM magnesium chloride, 10 mM Tris-hydrochloric acid, pH 9 at 25°C), 0.2 mM deoxyribonucleotide triphosphates, 20 pmoles of primers, 0.625 U Taq polymerase (Pharmacia Biotech, Milwaukee, WI), and a template. The mixture was overlaid with a drop of light mineral oil (Sigma, St. Louis, MO). The PCR was performed in a Perkin-Elmer Cetus Thermal Cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). Each cycle included denaturation at 94°C for 30 seconds, primer annealing at 55°C for 30 seconds, and extension at 72°C for 1 minute. An initial denaturation was performed at 94°C for 2 minutes, and in the final cycle the extension was 5 minutes at 72°C. Samples were subjected to 35–



40 cycles of amplification, including positive and negative controls in all runs. Positive controls comprised HPV 16 DNA cloned into pUC19 plasmid (Genemed, San Francisco, CA), DNA extracted from HPV 16-carrier cervical cancer, and DNA from HPV 6/11 carrier perianal condyloma acuminatum. All positive controls were typed by previous PCR assays using other type-specific HPV primers. The same DNA were used as negative controls in cross-reactions, and distilled water (instead of template) was used as reagent control.

The PCR product (10  $\mu$ l) was electrophoresed on 2.5% NuSieve GTG agarose gel (FMC Bioproducts, Rockland, ME), stained with ethidium bromide, and visualized by ultraviolet light.

Sterile materials were used throughout with strict precautions to avoid contamination and product carry-over.<sup>26</sup> When paraffin blocks were processed, the microtome blade was changed frequently and was cleaned thoroughly by xylene after each cut. DNA extraction, PCR, and gel electrophoresis were done in separate laboratories.

## Results

Neither high risk (HPV 16, 18, 31, 33, 52b, and 58) nor low risk (HPV 6 and 11) type viruses were detected in any sample (a representative gel is shown in Fig. 1). Positive controls always gave strong positivity and negative controls were consistently negative.

To ensure that sufficient DNA was present in the reaction mixture and that PCR was not inhibited, we tested our samples with primers of a normal human gene. The 214 base pair fragment of exon 5 of p53 gene could be amplified in all of our samples (Fig. 1). Because our PCR parameters were slightly modified from those described by Fujinaga et al.,<sup>25</sup> we compared the original and our method on the positive controls. No difference was found concerning the presence and the intensity of the specific product.

## Discussion

The potential role of HPV in the development of lung cancers emerged after HPV-suggestive histologic changes were described in the metaplastic bronchial mucosa adjacent to squamous cell carcinomas.<sup>27-29</sup> Later studies searching for HPV presence in lung cancers (Table 1) reported identification of high risk and low risk type viruses. The rate of positivity varied between 4.2% and 18.2%, with a negative correlation to the sensitivity of the method used. The highest HPV occurrence was found when ISH was used with biotinylated probes and the lowest when Southern blotting was applied. In addition, in the latter study, the only

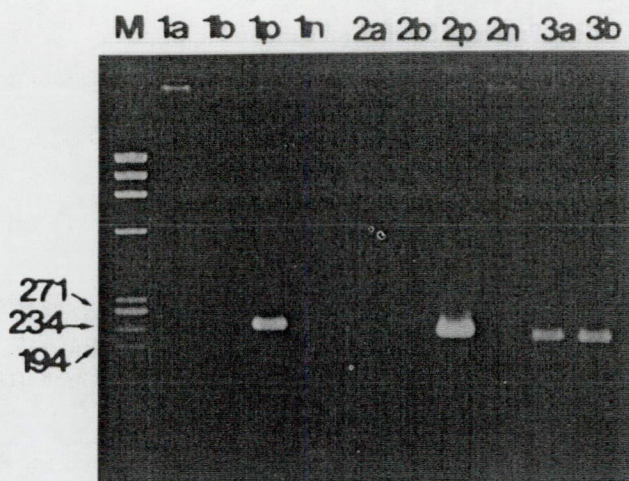


Figure 1. Agarose electrophoresis gel (2.5%) showing the results of PCR on a squamous and a large cell lung neoplasm. Amplifications with primers specific for high risk HPV showed no positivity in the squamous (1a) and the large cell (1b) carcinoma samples, but produced the expected 238 base pair fragment in the positive control (1p). Amplifications with primers specific for low risk HPV showed no positivity in the squamous (2a) and large cell (2b) carcinoma samples, but produced the expected 228 base pair fragment in the positive control (2p). The negative controls for high risk and low risk HPV are shown in 1n and 2n, respectively. The same lung cancer samples showed amplification for the 214 base pair fragment of exon 5 of p53 gene (3a-b). M: molecular weight marker (ØX 174 DNA-Hae III digest); the sizes of the bands (in base pairs) are shown to the left.

virus-positive case was suspected of being a metastasis from a former cervical cancer.

In the current work, we used PCR with primers capable of detecting at least eight types of HPV most frequently found in HPV-associated mucosal tumors. The sensitivity of our method is about 0.1 viral copy/cell,<sup>25</sup> which is approximately the same as that of Southern blotting,<sup>30,31</sup> and is higher than the 10-20 copies/cell detection limit of ISH.<sup>21,30</sup>

To our surprise, we did not detect HPV in any of the squamous and large cell lung cancer samples. Positive controls always showed positivity and negative controls were negative. Enough quality and quantity DNA was present in the reactions, because we were able to amplify a normal human gene. In view of these factors, technical error is unlikely and we strongly believe that our results were due to the absence of the examined HPV types. It is also possible that our samples harbored less than 0.1 viral copy/cell, which was the maximum sensitivity of the PCR. However, if HPV has a causative role in bronchial carcinogenesis, it should be present above this detection limit in the tumor.

The six cases with koilocytic atypia also proved to be negative, but this cytopathic effect is not uniformly associated with HPV infection and does not correlate strongly with the presence of the virus.<sup>30,32</sup> Conversely,



it is possible that HPV types, apart from those demonstrable by our consensus primers, were present in the koilocytic samples and in any of the examined carcinomas.

Another consideration might be that after contributing in the early phase of oncogenesis, the HPV DNA was deleted and became undetectable in the invasive cancer. The genome of the high risk type viruses may suffer partial deletion during integration into the host genome. However, the E6 and E7 open reading frames, which are responsible for the transforming ability of HPV, are virtually always conserved and expressed in most cancer cells.<sup>3,4</sup> Because our primers were located on the E6–E7 open reading frames, we should have detected the virus, had it been present.

HPV was found to show a similar type-specific prevalence and roughly equal racial distribution worldwide.<sup>33</sup> This suggests that our findings may not be highly influenced by epidemiologic factors, although this possibility cannot be eliminated completely. The divergence between the previous and the present results is more likely to be explained, at least in part, by the differences in the sensitivity and specificity of the methods applied. Because binding of the reporter molecules to endogenous biotin may lead to nonspecific signals,<sup>34</sup> an overestimation of the HPV presence in the previous studies done by nonisotopic ISH cannot be excluded. Indeed, the results of the single investigation based on Southern blotting (which is comparable to PCR in reliability) may be considered more similar to our findings.

In summary, our lung cancer cases were found not to be associated with HPV. Additional studies need to be performed, particularly by sophisticated molecular biologic techniques, to further clarify the role of HPV in bronchial carcinogenesis.

References

1. Van Ranst M, Kaplan JB, Burk RD. Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. *J Gen Virol* 1992; 73:2653–60.

2. de Villiers EM. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* 1989; 63:4898–903.

3. Arends MJ, Wyllie AH, Bird CC. Papillomaviruses and human cancer. *Hum Pathol* 1990; 21:686–98.

4. zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancers. *Virology* 1991; 184:9–13.

5. de Villiers EM, Weidauer H, Otto H, zur Hausen H. Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *Int J Cancer* 1985; 36: 575–8.

6. Furuta Y, Takasu T, Asai T, Shinohara T, Sawa H, Nagashima K, et al. Detection of human papillomavirus DNA in carcinomas of the nasal cavities and paranasal sinuses by polymerase chain reaction. *Cancer* 1992; 69:353–7.

7. Wiener JS, Liu ET, Walther PJ. Oncogenic human papillomavirus type 16 is associated with squamous cell cancer of the male urethra. *Cancer Res* 1992; 52:5018–23.

8. Anwar K, Naiki H, Nakakuki K, Inuzuka M. High frequency of human papillomavirus infection in carcinoma of the urinary bladder. *Cancer* 1992; 70:1967–73.

9. Chang F, Syrjänen S, Shen Q, Ji H, Syrjänen K. Human papillomavirus (HPV) DNA in esophageal precancer lesions and squamous cell carcinomas from China. *Int J Cancer* 1990; 45:21–5.

10. Toh Y, Kuwano H, Tanaka S, Baba K, Matsuda H, Sugimachi K, et al. Detection of human papillomavirus DNA in esophageal carcinoma in Japan by polymerase chain reaction. *Cancer* 1992; 70:2234–8.

11. Ogura H, Watanabe S, Fukushima K, Masuda Y, Fujiwara T, Yabe Y. Presence of human papillomavirus type 18 DNA in a pharyngeal and a laryngeal carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1991; 82: 1184–6.

12. Mounts P, Shah KV, Kashima H. Viral etiology of juvenile- and adult-onset squamous papilloma of the larynx. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:5425–9.

13. Zarod AP, Rutherford JD, Corbitt G. Malignant progression of laryngeal papilloma associated with human papilloma virus type 6 (HPV-6) DNA. *J Clin Pathol* 1988; 41:280–3.

14. Popper HH, Wirsberger G, Jüttner-Smolle FM, Pongratz MG, Sommersgutter M. The predictive value of human papilloma virus (HPV) typing in the prognosis of bronchial squamous cell papillomas. *Histopathology* 1992; 21:323–30.

15. Bejui-Thivolet F, Chardonnet Y, Patricot LM. Human papillomavirus type 11 DNA in papillary squamous cell lung carcinoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1990; 417:457–61.

16. Guillou L, Sahli R, Chaubert P, Monnier P, Cottat JF, Costa J. Squamous cell carcinoma of the lung in a nonsmoking, nonirradiated patient with juvenile laryngotracheal papillomatosis. *Am J Surg Pathol* 1991; 15:891–8.

17. DiLorenzo TP, Tamsen A, Abramson AL, Steinberg BM. Human papillomavirus type 6a DNA in the lung carcinoma of a patient with recurrent laryngeal papillomatosis is characterized by partial duplication. *J Gen Virol* 1992; 73:423–8.

18. Stremlau A, Gissmann L, Ikenberg H, Stark M, Bannasch P, zur Hausen H. Human papillomavirus type 16 related DNA in an anaplastic carcinoma of the lung. *Cancer* 1985; 55:1737–40.

19. Syrjänen K, Syrjänen S, Kellokoski J, Kärjä J, Mäntyjärvi R. Human papillomavirus (HPV) type 6 and 16 DNA sequences in bronchial squamous cell carcinomas demonstrated by in situ DNA hybridization. *Lung* 1989; 167:33–42.

20. Béjui-Thivolet F, Liagre M, Chignol MC, Chardonnet Y, Patricot LM. Detection of human papillomavirus DNA in squamous bronchial metaplasia and squamous cell carcinomas of the lung by in situ hybridization using biotinylated probes in paraffin-embedded specimens. *Hum Pathol* 1990; 21:111–6.

21. Yousem SA, Ohori NP, Sonmez-Alpan E. Occurrence of human papillomavirus DNA in primary lung neoplasms. *Cancer* 1992; 69:693–7.

22. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239:487–91.

23. Arends MJ. Identification of HPV: in situ hybridization or polymerase chain reaction? *J Pathol* 1991; 164:191–3.

24. Jackson DP, Lewis FA, Taylor GR, Boylston AW, Quirke P. Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 1990; 43:499–504.

25. Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K. Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 1991; 72:1039–44.

26. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339:237-8.
27. Syrjänen KJ. Condylomatous changes in neoplastic bronchial epithelium: report of a case. *Respiration* 1979; 38:299-304.
28. Syrjänen KJ. Epithelial lesions suggestive of a condylomatous origin found closely associated with invasive bronchial squamous cell carcinomas. *Respiration* 1980; 40:150-60.
29. Syrjänen KJ. Bronchial squamous cell carcinomas associated with epithelial changes identical to condylomatous lesions of the uterine cervix. *Lung* 1980; 158:131-42.
30. Okagaki T. Impact of human papillomavirus research on the histopathologic concepts of genital neoplasms. In: Sasano N, editor. *Gynecological tumors: current topics in pathology*. Vol. 85. Berlin: Springer-Verlag, 1992:273-307.
31. Morrison EAB, Goldberg GL, Kadish AS, Burk RD. Polymerase chain reaction detection of human papillomavirus: quantitation may improve clinical utility. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2539-43.
32. Nuovo GJ, Nuovo MA, Cottrill S, Gordon S, Silverstein SJ, Crum GP. Histological correlates of clinically occult human papillomavirus infection of the uterine cervix. *Am J Surg Pathol* 1988; 12:198-204.
33. Tham KM, Chow VTK, Singh P, Tock EPC, Ching KC, Lim-Tan SK, et al. Diagnostic sensitivity of polymerase chain reaction and Southern blot hybridization for the detection of human papillomavirus DNA in biopsy specimens from cervical lesions. *Am J Clin Pathol* 1991; 95:638-46.
34. Höfler H. Principles of in situ hybridization. In: Polak JM, McGee JO'D, editors. *In situ hybridization: principles and practice*. New York: Oxford University Press, 1990:15-29.



**III.**



# Mutációanalízis hypertrophiás cardiomyopathiában

DR. SEPP RÓBERT

SZENT-GYÖRGYI ALBERT ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM, II. Sz. Belgyógyászati Klinika

(Igazgató: Prof. Dr. Csanády Miklós egyetemi tanár)

**Kulcsszavak:** *hypertrophiás cardiomyopathia • génmutáció • genetikai analízis*

**Összefoglaló:** A közelmúlt évek genetikai kutatásai számos gén mutációját írták le a hypertrophiás cardiomyopathia (HCM) hátterében, köztük a  $\beta$  myozin nehéz lánc-, troponin T-,  $\alpha$ -tropomyozin-, valamint a myozin kötő C fehérjét kódoló gének mutációit. Mivel ezek a gének a sarcomer strukturális fehérjéit kódolják, a HCM jelen felfogásunk szerint a sarcomer betegségének tekinthető, bár ismert, hogy más gének mutációi is létrehozhatnak HCM képeben megjelenő szívbetegséget.

A HCM hátterében azonosított molekuláris eltérések a genetikai diagnosztikán túl a betegség klinikai megítélését is befolyásolhatják. Ismertté vált, hogy egyes mutációk a HCM korai manifesztációjával, a hirtelen szívhalál fokozott kockázatával járnak, míg más mutációk a betegség kórlefolását lényegileg nem befolyásolják. Mindezek alapján a betegek és családtagjaik genetikai szűrővizsgálatán túl várhatóan nagy jelentősége lesz a HCM-et okozó mutáció pontos meghatározásának is, melyre egy konkrét példát is bemutat a jelen cikk.

**Keywords:** *hypertrophic cardiomyopathy • mutation • genetical analysis*

**Summary:** Molecular genetic research in recent years has identified several genes causing hypertrophic cardiomyopathy (HCM), amongst them that of coding the cardiac  $\beta$  myosin heavy chain, troponin T,  $\alpha$ -tropomyosin and myosin binding protein C. As these genes encode structural proteins of the sarcomere, HCM is regarded today as the disease of the sarcomere, but mutations in other genes can also cause a heart disease manifesting as HCM.

The identified molecular basis of HCM may influence not only the genetic diagnosis but the clinical management of the disease as well. It came to light that some mutations were associated with the early manifestation of HCM and with a higher risk of sudden cardiac death while others did not influence the natural course of the disease considerably. Because of this it is likely that apart of the genetic screening of HCM patients and their relatives, the precise identification of the disease causing mutation is going to be paramount. Such an example for mutation detection is given in this article.

## BEVEZETÉS

1990-ben írták le az első hypertrophiás cardiomyopathiát (HCM) okozó etiológiai mutációt a  $\beta$  myozin nehéz lánc ( $\beta$ -MHC) génen [5], s az azóta eltelt évek kutatásai további gének mutációit tárták fel a betegség hátterében [10], [12], [1]. Mai ismereteink szerint a HCM genetikailag heterogén betegség, a  $\beta$ -MHC génen kívül a troponin T- (TnT), az  $\alpha$ -tropomyozin- ( $\alpha$ -TM) valamint a myozin kötő C fehérje (MyBC) gének mutációi okoznak HCM-et, de további gének eltéréseinek azonosítása várható a jövőben. Mivel a napjainkig azonosított kóroki gének sarcomer fehérjéket kódolnak, ezért a HCM a sarcomer betegségének tekinthető, bár egyéb génelváltozások is létrehozhatnak a HCM morfológiai képeben megjelenő szívbetegséget.

A HCM molekuláris genetikájának megismerésével párhuzamosan felvetődött az új ismeretek klinikai adaptálásának, s a betegség genetikai reklasifikációjának az igénye is. Bár a rendelkezésre álló adatok még távolról sem konkluzívak, az eddigi ismeretek szerint a HCM-es betegek genetikai analízise hasznos adatokat nyújthat az egyedi esetek klinikai lefolyásának és rizikójának megítélése szempontjából is.

## HCM-ET OKOZÓ GÉN MUTÁCIÓK

A  $\beta$ -myozin nehéz lánc gén ( $\beta$ -MHC) volt az első, melyről bebizonyosodott, hogy a HCM kialakulásában szerepet játszik [5]. A 14-es kromoszómán (14q1) elhelyezkedő  $\beta$ -MHC gén több, mint 40 mutációját azonosították eddig HCM-es betegekben [8]. A mutációk szinte kivétel nélkül pontmutációk, melyek a gén első 23 exonját érintik, a gén azon részét, mely a fehérje globuláris feji ill. csukló részét kódolják. A  $\beta$ -MHC gén jelen adataink szerint az HCM esetek mintegy 30-35%-áért felelős.

A troponin T (TnT, 1q3) gén és az  $\alpha$ -tropomyozin ( $\alpha$ -TM, 15q2) gén mutációit 1994-ben írták le HCM-es családokban [10]. A TnT génen mindeztáig 10 pontmutációt, egy trinukleotid deléciót és egy splice donor site mutációt írtak le, mely utóbbi a fehérje terminális 22 aminosavjának delécióját

**Levelezési cím:** DR. SEPP RÓBERT,  
6720 Szeged, Korányi fs. 6. Telefon/fax: 06 (62) 311-787  
E-mail: sepp@in2nd.szote.u-szeged.hu

okozza [13]. Mindezek a mutációk a fehérje  $\alpha$ -tropomyozin, troponin C és troponin I kötő funkcionális doménjeit érintik, s szerepet játszhatnak a HCM pathogenezisében. Az  $\alpha$ -tropomyozin génen eddig 4 pontmutációt azonosítottak, melyek a fehérje  $\text{Ca}^{++}$  dependens troponin T kötőhelyén hozhatnak létre szerkezeti elváltozást [10]. A troponin T mutációk a HCM-es esetek mintegy 15%-áért, az  $\alpha$ -tropomyozin mutációk mintegy 5%-áért lehetnek felelősek.

A napjainkig ismert HCM-et okozó utolsó génelváltozás, a myozinkötő C fehérje (cardiac myosin binding protein C, MyBC, 11p13-q13) gén azonosítására 1996-ban került sor [12], [1]. A génen talált elváltozások meglehetősen heterogének, splice donor és acceptor site mutációkon kívül egy pentanukleotid deléciót és egy 18 bázispárból álló duplikációt is megfigyeltek. A MyBC a sarcomerben myozinhoz és titinhez kötődik, s többek között a sarcomer aktív és passzív tenzióját befolyásolja. Az említett mutációk elsősorban a molekula myozinkötő doménjét befolyásolják.

Azt, hogy ezek a mutációk etiológiai mutációk és ok-okozati kapcsolatban állnak a HCM kialakulásával, több adat is alátámasztja. Többek között, a fenti mutációkat a legtöbb rasszban leírták már; mindig csak HCM-es családok érintett tagjaiban, s sohasem az egészséges családtagokban, vagy a normál populációban. A mutáns gének olyan fehérjéket kódolnak, melyek funkciója esszenciális a szív működése szempontjából, s a mutációk a fehérjék evolúció során megőrzött, tehát vélhetőleg kulcspozícióban lévő aminosavjait érintik. A legdöntőbb azonban az újonnan kialakult, de novo mutációk megfigyelése, melyek közül némelyik átörökíthetőnek bizonyult [11].

A fenti négy gén mutációján kívül további gének eltérését is leközölték már HCM képében jelentkező szívbetegségben. Ilyen gének közé tartozik az esszenciális és regulatorikus myozin könnyű lánc gén, melyek mutációit egy speciális, midventrikuláris obstrukcióval járó HCM-ben írták le [9]. Egy német kutatócsoport a dezmin gén mutációját találta egy HCM-es családban [2]. Ez utóbbi megfigyelések még megerősítésre várnak, hiszen egyelőre csak izolált esetleírásokról van szó, s még kérdéses, hogy ezek a gének „klasszikus” HCM-et hoznak létre vagy a HCM ún. fenokópiáit. Különösen érdekes ez a kérdés a dezmin gén esetében, hiszen ez megkérdőjelezné a „HCM=sarcomer betegség” koncepcióját, mivel a dezmin az intermedier filamentum proteinek közé tartozik. Az bizonyos, hogy a jelenleg ismert HCM-es családok mintegy 40%-a egyik fenti génhez sem köthető, tehát még egy, vagy esetleg több gén azonosítása várható.

## GENOTÍPUS-FENOTÍPUS ÖSSZEFÜGGÉSEK

A HCM háttérében azonosított molekuláris eltérések a közvetlen klinikai gyakorlat számára a következő fontos kérdéseket vetik fel: 1. lehetséges-e a HCM genetikai klasszifikációja („troponin T HCM”, „ $\beta$  myozin nehéz lánc HCM”, stb.); 2. egy adott mutáció kizárólagosan meghatározza-e az adott klinikai képet („fenotípus”), elsősorban a kórlefolysást?

Konkluzív válasz a fenti kérdésekre még nem adható a genetikailag karakterizált HCM-es esetek vizsgálata között kis száma miatt. Jelen adatok azonban azt valószínűsítik, hogy a genetikai analízis a HCM-es betegek egyik fontos vizsgálata lesz a jövőben. Mai ismereteink szerint a különböző gének mutációja talaján kialakult HCM-es esetek nagy átfedést mutatnak klinikai megjelenésükben, s ez lehetetlenné teszi csupán a klinikai kép alapján az érintett gén megítélését. Adatok utalnak azonban arra, hogy egy adott gén különböző mutációja ha nem is kizárólagosan, de jelentős mértékben meghatározza a HCM klinikai megjelenését.

A  $\beta$ -MHC Arg403Glu mutációja pl. magas penetranciával, a hirtelen szívhalál (SCD) fokozott gyakoriságával, s kifejezett septumhypertrophiával jár. Marian et al. közlése szerint az Arg403 Glu mutációt hordozó két család 20 érintett tagja közül 11 halt meg fiatal korban a betegség következtében, 9 hirtelen szívhalállal, átlagéletkoruk 33 év [6]. Watkins et al. három, Arg403Glu mutációt hordozó családot írt le, ahol a 44 génhordozó közül 21 halt meg korán, 9 hirtelen szívhalál következtében, akik átlagéletkora szintén 33 év volt [14]. Egy harmadik kutatócsoport szerint az Arg403Glu mutációt hordozó család 15 érintett családtagja között 6 SCD történt, 19 és 45 éves kor között [4]. Érdekességgéppen egy koreai család 6 Arg403Glu mutációhordozója között viszont egy haláleset sem történt, felvetve ezzel a különböző rasszokban jelenlévő esetleges genetikai háttértényezők szerepét. Hasonló, „malignus” lefolyást mutatnak a  $\beta$ -MHC Arg719Gln, valamint az Arg453Cys mutációk is.

A „malignus”  $\beta$ -MHC mutációkkal szemben pl. a  $\beta$ -MHC Leu908Val mutációt alacsony penetrancia, benignus kórlefolys s az SCD ritka előfordulása jellemzi [3]. Egy közölt család 46 génhordozó családtagja között mindössze 2 haláleset fordult elő, s a 60 éves kumulatív túlélési arány 92% volt. Hasonlóan jó prognózisú a  $\beta$ -MHC Gly256Glu mutáció, ahol az SCD csupán 2%-ban fordult elő 50 éves kor betöltéséig [4]. A  $\beta$ -MHC Val606Met mutáció szintén benignus lefolyású volt 3 kisebb és egy nagyobb



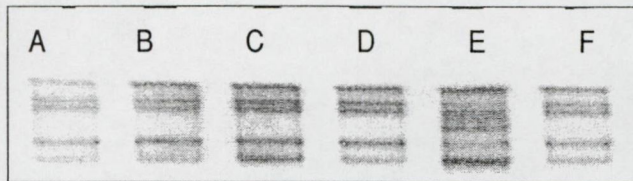
családban, ahol 30 génhordozó közül mindössze ketten haltak meg a HCM következtében [14], [7]. Fananpazir et al. azonban közölt egy családot, ahol a Val606Met mutáció a HCM súlyos klinikai manifesztációjával és az SCD halmozott előfordulásával társult [4]. Mindezek az eredmények jól mutatják, hogy még számos adatnak kell összegyűlnie ahhoz, hogy a genotípus-fenotípus korreláció problematikusabb és árnyaltabb képünk legyen.

## GENETIKAI ANALÍZIS HCM-BEN

A fent vázolt potenciális összefüggések miatt várhatóan a HCM-es betegekben nemcsak a génhordozó állapot megítélése lesz fontos, hanem a pontos mutáció meghatározása is. Mivel a HCM genetikailag igen heterogén (több gén lehet érintett), egy egyszerű és gyors genetikai teszt kidolgozása nehézségekbe ütközik.

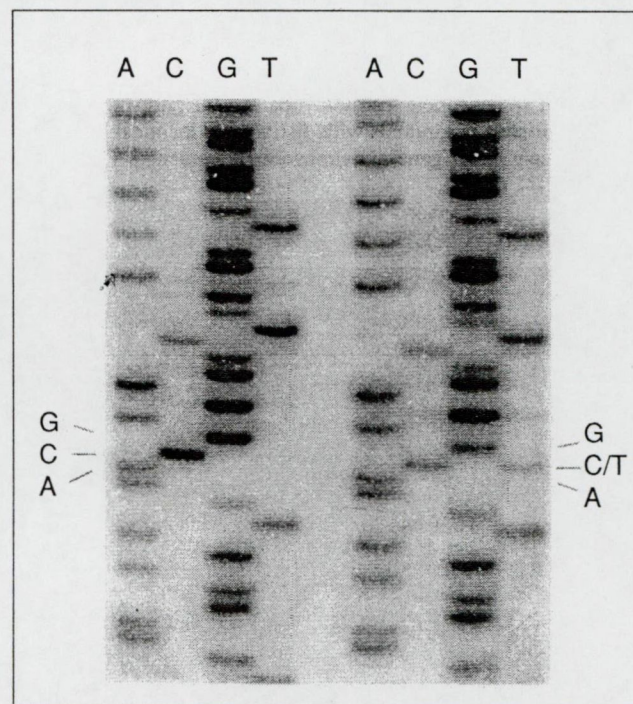
A jelenleg leggyakrabban használt eljárások általában többlépcsős megközelítést követnek. Amennyiben a HCM családi halmozódást mutat, s az érintett családtagok száma nagy (az esetek csak kis hányada ilyen), polimorf markerek használatával megítélhető, hogy a betegség köthető-e az eddig leírt gének valamelyikéhez, s ha igen, akkor melyikhez. Ezután a gén nagyobb szakaszainak szűrésével meg lehet határozni, hogy a gén melyik régiójára lokalizálható a specifikus génelváltozás, majd ezt a régiót szekvenálni kell, hogy a pontos mutációt meghatározhassuk.

Mivel a HCM-es családokban általában csak néhány családtag érintett, ezért a genetikai szűrést gyakorlatilag „vakon” kell elkezdni. Több módszer van használatban (heteroduplex analízis, RNase protection assay, denaturant gradient gel electrophoresis stb.), a legelterjedtebb talán a ‘single strand conformation polymorphism’ (SSCP) analízis. Az SSCP analízis alapja, hogy az egyszálúvá denaturált DNS renaturáció során egy specifikus másodlagos szerkezetet vesz fel, mely kizárólag elsődleges szerkezetétől (bázissorrendjétől) függ. Amennyiben ebben az elsődleges bázissorrendben eltérés található (tehát a DNS mutáns), akkor ez nagymértékben megváltoztathatja a másodlagos szerkezetet, ami a DNS szál eltérő elektroforetikus mobilitásában nyilvánul meg. Az SSCP előnye, hogy viszonylag egyszerű és hogy alkalmazása során kiküszöbölhető a radioaktív izotópok használata. Hátránya viszont, hogy munka- és időigényes, az optimális eredményhez két különböző standard hőmérsékletű elektroforézist kell végezni, s hogy relatíve rövid (200-300 bp) génszakasz vizsgálható csak.



1. ábra. A myozin nehéz lánc gén 23-as exonjának ‘single strand conformation polymorphism’ (SSCP) analízise, poliakrilamid gélen való futtatás és ezüstnitráttal való festés után. A negatív kontrollokhoz viszonyítva (A, B, C, D, F, G) az E mintában két eltérő mobilitású band utal mutáns DNS szál jelenlétére.

SSCP során először a vizsgálni kívánt kódoló génszakaszt (exon) polimeráz láncreakcióval (PCR) amplifikáljuk. A PCR termékeket hővel vagy alkálival denaturáljuk, majd nem denaturáló poliakrilamid gélen (PAGE) elektroforetizáljuk. Az elektroforézist konstans, s optimális esetben két különböző hőmérsékleten kell végezni. Az elektroforézis végén a gélben futott DNS szál ezüst-nitráttal megfesthető, s pozitív SSCP esetén eltérő mobilitású „band”-eket látunk (1. ábra). Mivel a mutációk szinte kivétel nélkül heterozigóták, a normális és abnormis módon migráló bandek együtt jelentkeznek. A pozitív SSCP-t mutató PCR termék standard módon szekvenálható, s így a mutáció pontosan meghatározható (2. ábra).



2. ábra. Pozitív SSCP-t mutató minta szekvenálása. A minta heterozigóta a myozin nehéz lánc gén 23-as exonjában található C-T tranzícióra.



Mivel a genetikai szűrés igen időigényes (a  $\beta$ -MHC gén esetében pl. legalább 23 exon szűrését kell elvégezni), jelenleg rutinszerűen még nem alkalmazható a klinikumban, s a genetikai szűréssel a betegséget kutató genetikai laboratóriumok foglalkoznak. Mindazonáltal a molekuláris genetika metodológiája olyan ütemben fejlődik, hogy a genetikai diagnosztika rutinszerű bevezetése a klinikumba a közeljövőben nagy bizonyossággal megjósolható.

#### Köszönetnyilvánítás

A munka az European Society of Cardiology Research Fellowship-ja támogatásával készült. A szerző köszönetet mond Dr. Jebelevszki Éva nélkülözhetetlen lektori munkájáért, s Ákosi Gábor fotodokumentációjáért.

#### Irodalom

1. Bonne G., Carrier L., Bercovici J., Cruaud C., Richard P., Hainque B., Gautel M., Labeit S., James M., Beckmann J.: Cardiac myosin binding protein-C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 11, 438-40 (1996).
2. Brown B. D., Scheffold T., Rottbauer W., Zehelein J., Frantz W., Rodemer E., Katus H. A.: Intermediate filament desmin gene missense mutation found in a family suffering from hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, Supplement I 92, I-233 (1995).
3. Epstein N. D., Cohn G. M., Cyran F., Fananapazir L.: Differences in clinical expression of hypertrophic cardiomyopathy associated with two distinct mutations in the beta-myosin heavy chain gene. A 908Leu----Val mutation and a 403Arg----Gln mutation [see comments]. *Circulation* 86, 345-52 (1992).
4. Fananapazir L., Epstein N. D.: Genotype-phenotype correlations in hypertrophic cardiomyopathy. Insights provided by comparisons of kindreds with distinct and identical beta-myosin heavy chain gene mutations [see comments]. *Circulation* 89, 22-32 (1994).
5. Geisterfer-Lowrance A. A. T., Kass S., Tanigawa G., Vosberg H.-P., McKenna W. J., Seidman C. E., Seidman J. G.: A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a  $\beta$  cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell* 62, 999-1006 (1990).
6. Marian A. J.: Sudden cardiac death in patients with hypertrophic cardiomyopathy: from bench to bedside with an emphasis on genetic markers. *Clin Cardiol* 18, 189-98 (1995).
7. Marian A. J., Mares A., Jr., Kelly D. P., Yu Q. T., Abchee A. B., Hill R., Roberts R.: Sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy. Variability in phenotypic expression of beta-myosin heavy chain mutations. *Eur. Heart J.* 16, 368-76 (1995).
8. Marian A. J., Roberts R.: Recent advances in the molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 92, 1336-47 (1995).
9. Poetter K., Jiang H., Hassanzadeh S., Master S. R., Chang A., Dalakas M. C., Rayment I., Sellers J. R., Fananapazir L., Epstein N. D.: Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. *Nat Genet* 13, 63-9 (1996).
10. Thierfelder L., Watkins H., MacRae C., Lamas R., McKenna W., Vosberg H. P., Seidman J. G., Seidman C. E.: Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* 77, 701-12 (1994).
11. Watkins H., Anan R., Coviello D. A., Spirito P., Seidman J. G., Seidman C. E.: A de novo mutation in alpha-tropomyosin that causes hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 91, 2302-5 (1995).
12. Watkins H., Conner D., Thierfelder L., Jarcho J. A., MacRae C., McKenna W. J., Maron B. J., Seidman J. G., Seidman C. E.: Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 11, 434-7 (1996).
13. Watkins H., McKenna W. J., Thierfelder L., Suk H. J., Anan R., O'Donoghue A., Spirito P., Matsumori A., Moravec C. S., Seidman J. G.: Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 332, 1058-64 (1995).
14. Watkins H., Rosenzweig A., Hwang D. S., Levi T., McKenna W., Seidman C. E., Seidman J. G.: Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy [see comments]. *N. Engl. J. Med.* 326, 1108-14 (1992).



## IV.

# A hypertrophiás cardiomyopathia klinikai és molekuláris genetikája

Sepp Róbert dr. és Csanády Miklós dr.

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem, Szeged, II. Belgyógyászati Klinika (igazgató: Csanády Miklós dr.)

A legutóbbi évek molekuláris genetikai kutatásai hét gén, a  $\beta$ -miozin nehéz lánc, troponin T,  $\alpha$ -tropomiozin, miozinkötő C fehérje, esszenciális miozin könnyű lánc, regulatorikus miozin könnyű lánc és troponin I gének mutációit fedezték fel a hypertrophiás cardiomyopathia hátterében. A mutációk a fenti gének evolúció során megőrzött, kritikus pozícióban lévő nukleotidjait érintik, s az érintett fehérje vitális funkcióit károsítják. Mivel mind a hét gén a szívizom sarcomerjének felépítésében részt vevő proteint kódol, a hypertrophiás cardiomyopathiát jelen tudásunk szerint a sarcomer betegségének tekinthetjük. Adatok utalnak arra, hogy bizonyos mutációk „malignus” klinikai képpel, hamar kifejlődő, súlyos tünetekkel és a hirtelen szívhalál kifejezett kockázatával járnak, míg más mutációk kedvezőbb prognózisúak. Az is bizonyos, hogy a betegség alapjául szolgáló mutáción kívül más faktorok, köztük modifikátor gének is meghatározzák a hypertrophiás cardiomyopathia klinikai megjelenését. A genetikai ismereteknek már napjainkban is számos klinikai vonatkozása ismert, és a mutációhordozó betegek vizsgálata alapján a hypertrophiás cardiomyopathia klinikai kritériumait is redefiniálták. A jövő kihívásai közé a genetikai rutindiagnosztika és az esetleges génterápia kifejlesztése tartozik.

**Kulcsszavak:** hypertrophiás cardiomyopathia, molekuláris genetikai, génmutáció

1958-ban jelent meg a British Heart Journalban az a publikáció, melyben Donald Teare hirtelen szívhalált halt nyolc fiatal kórboncolásánál észlelt aszimmetrikus szív-hypertrophiáról számolt be (39). Egy lábjegyzetben megjegyezte, hogy egyikük testvére szintén hirtelen szívhalálban hunyt el, s az érintett családról egy két évvel később közölt tanulmány további hat beteget talált a vérrokonok között (17). Ma már tudjuk, hogy a család betegségét – melyet hypertrophiás cardiomyopathia (HCM) néven jegyez az orvostudomány – egy pontmutáció okozta a béta-miozin nehéz lánc fehérjét kódoló gén 14-es exonjában (47), mely egyike a HCM-et okozó génmutációknak.

Fentiek jól példázzák azt a hatalmas fejlődést, melyen keresztül a molekuláris genetikai és ezen belül a cardiovascularis genetikai átment. A legújabb eredmények teljesen átforgalmazták egyes kardiológiai betegségekről vallott felfogásunkat, s megjósolható, hogy a nem is

**Clinical and molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy.** Recent developments in molecular genetics have allowed to identify mutations in seven genes coding the  $\beta$  myosin heavy chain, troponin T,  $\alpha$  tropomyosin, myosin binding protein C, essential and regulatory myosin light chains and troponin I causing hypertrophic cardiomyopathy. These mutations affect critical, evolutionary conserved nucleotides of these genes and influence vital functions of the encoded proteins. As all seven genes encodes sarcomeric proteins in the heart muscle, hypertrophic cardiomyopathy is regarded these days as a disease of the sarcomer. Recent data indicate that some mutations are associated with “malignant” clinical picture, with rapidly developing, severe symptoms of the disease and increased risk of sudden cardiac death while other mutations bear a more favourable prognosis. Apart of the disease causing mutation other factors, including disease modifier genes, are likely to make an impact on the clinical appearance of hypertrophic cardiomyopathy. The knowledge provided by molecular genetics influences the clinical management of the disease even today and based on the investigation of mutation carrying patients new diagnostic criteria was proposed for hypertrophic cardiomyopathy. The challenge for the future is the establishment of routine genetic diagnostics and the development of possible gene therapy.

**Key words:** hypertrophic cardiomyopathy, molecular genetics, gene mutations

olyan távoli jövőben ezen új ismeretek a közvetlen klinikai gyakorlatban is mindennapi alkalmazást nyernek. A legutóbbi évtized molekuláris genetikai kutatásai a HCM hátterében a sarcomer kontraktilis fehérjeit kódoló gének mutációit derítették fel, a HCM-et a sarcomer betegségeként definiálva. Mivel a témában magyar nyelvű összefoglaló közlemény nem jelent még meg, ezért indokoltnak tartjuk az utóbbi évek genetikai felfedezéseit áttekinteni, különös tekintettel a klinikai összefüggésekre.

## Epidemiológiai adatok

A hypertrophiás cardiomyopathia jelenleg használt WHO klasszifikációja szerint főként aszimmetrikus, első-sorban a septumot érintő kamrahypertrophia képében megjelenő szívélváltozás, melyet a bal kamra úrtartal-



1. táblázat: A négy leggyakoribb, HCM-et okozó gén fontosabb jellemzői (lásd szöveg). HCM = hypertrophiás cardiomyopathia; BK = bal kamra

Gén (génszimbólum)	Lókuszt	Arány HCM-ben	Penetrancia	BK hypertrophia	Klinikai kép, prognózis
β-miozin nehéz lánc gén (MYH7)	14q12	≈35	≈70–100	enyhe-súlyos	benignus-malignus (mutációfüggő)
α-tropomiozin gén (TPM1)	15q22	≈5	≈90–100	enyhe-középsúlyos	benignus
Troponin T gén (TNNT2)	1q3	≈15	≈70–80	enyhe (néha szubklinikus)	malignus
Miozinkötő C fehérje gén (MYBPC)	11p11.2	≈15	≈45–70 (korfüggő)	enyhe-középsúlyos	benignus

mának csökkenése, arrhythmiai gyakori jelenléte és a hirtelen szívhalál fokozott kockázata jellemez (36). Különböző epidemiológiai adatok a HCM prevalenciáját 3,2–33/100 000 főben adják meg (1), ezen adatok valószínűleg alulbecsülik a HCM valódi előfordulását. Egy nemrég amerikai felmérés szerint a betegség jóval gyakoribb, mint korábban gondolták, 23 és 35 év közötti fiatalok körében prevalenciáját 1/500 főnek találták (29). Hasonló epidemiológiai adatok hazánkban nem állnak rendelkezésre.

### Klinikai genetika

A HCM autoszomális domináns módon öröklődik, változó penetranciával és expresszióval. Sporadikus esetek is ismertek és de novo germ-line mutációkat is írtak már le. Bár recesszív öröklésmentről is beszámoltak néhányan (12), ezt az eddig ismertté vált molekuláris genetikai adatok nem támogatják. Ismertek szindróma-asszociált [pl. Csanády's cardiomyopathy (9)] és mitochondriális mutációk következtében kialakuló HCM-es esetek is (20) (ezeket a kórképeket jelen közlemény nem tárgyalja).

Adatok utalnak arra, hogy a betegség fenotípusa változó a különböző érintett gének és mutációk függvényében. A HCM penetranciája korfüggő (korral nő), a betegség kifejlődése nem jellemző pubertás előtt. A HCM kifejlődése – bár nem ismeretlen – ritka újszülöttkorban. A mutáns gén(ek) inkomplett vagy részleges penetranciáját mutatja az, hogy obligát génhordozókat lehet megfigyelni klinikai tünetek nélkül. A betegség morfológiája és a betegség súlyossága még egyes családokon belül és monozigóta ikrek között is változó lehet (35), mely arra utal, hogy a fenotipikus expresszió más, környezeti vagy genetikai faktorok által is befolyásolt (l. később, ún. modifikátor gének).

### Molekuláris genetika

Mai ismereteink szerint a HCM-es esetek 50–60%-áért hét, kontraktilis fehérjét kódoló gént érintő mutáció a felelős: a β-miozin nehéz lánc, troponin T, α-tropomiozin, miozinkötő C fehérje, esszenciális miozin könnyű

lánc, regulatorikus miozin könnyű lánc és troponin I gént érintő mutációk (1. táblázat). A fenti etiológiai géneken kívül egy további genetikai lókuszt írtak le a 7-es kromoszómán (7q3) egy családban, mely tagjai HCM és/vagy Wolff-Parkinson-White-szindrómában szenvednek (24).

Mivel a fenti fehérjék a sarcomer kontrakció-relaxáció folyamatában közvetlenül vagy közvetetten részt vesznek, ezért a HCM-et jelen tudásunk szerint a sarcomer betegségének tekinthetjük (42).

Ismert egy közlemény a dezmin gén (mely az intermedier filamentum dezmin proteint kódolja) mutációjáról egy német családban (3), azonban ez az izolált megfigyelés még további megerősítésre szorul. További genetikai heterogenitásra utal az a tény, hogy a vizsgált családok mintegy 40–50%-ában (!) a betegség az eddigi ismert génekhez nem köthető, tehát további gén/gének azonosítása várható a jövőben.

#### Hypertrophiás cardiomyopathiát okozó génmutációk Béta-miozin nehéz lánc gén (MYH7, 14q12)

1989-ben egy népes francia-kanadai HCM-es családban (44 HCM-es, 58 egészséges családtag) „linkage mapping”-gel lokalizálták az első HCM-et okozó génelváltozás helyét a 14-es kromoszóma hosszú karjára (14q1), ahol az α- és β-miozin nehéz lánc (MYH 6 és 7) gén helyezkedik el (21). (A „linkage mapping” egy humángenetikai módszer, segítségével egy öröklődést mutató beteséget felelős gén kromoszomális pozícióját lehet meghatározni.)

Egy évvel később a Cell-ben jelent meg két közlemény a HCM-es családokban talált első konkrét génelváltozásokról. Egy családban egy α/β-MYH hybrid allélt találtak (38), mely feltehetőleg egy egyenlőtlen meiotikus cross-over következményként jöhetett létre. Egy másik – az eredetileg vizsgált francia-kanadai – családban a MYH7 gén 13-as exonjának CGG403CAG missense mutációját észlelték (16), mely az eredeti fehérje 403-as pozíciójában lévő arginin glutaminra történő cseréjét okozza (Arg403Gln).

Azóta a MYH7 gén több, mint 40 mutációját azonosították mind familiáris, mind sporadikus esetekben. Érdekes módon az első HCM-es génelváltozásként leközölt α/β MYH hybrid allélról kiderült, hogy valószínűleg csak a betegséget jelző „marker”-ként lett azonosítva, s a betegséget a másik, nem hibrid allélon a későbbiekben talált pontmutáció (Arg453Cys) okozta (47). A MYH7 gént érintő mutációk szinte kivétel nélkül

pontmutációk, melyek a gén első 23 exonját érintik, a gén azon részét, mely a protein globuláris feji, ill. csuklószzerű köztes részét kódolják.

A pontmutációkon kívül egy inzerció/delécio típusú mutációt is közöltek (10), mely szintén a fehérje központi jelentőségű, ATP-áz aktivitású részén idéz elő strukturális változást. Néhány mutációt, mint pl. az Arg403Gln vagy a Val606Met több családban is megfigyeltek (11, 48), míg más mutációk mindaddig egyedinek bizonyultak. A különböző családokban megfigyelt azonos mutációk haplotípus analízise azt mutatta, hogy ezek egymástól független mutációs események közvetkezmenyei, s nem egy „ős” mutáció öröklődései (48). Mindez arra utal, hogy a MYH7 mutációk viszonylag nem régi eredetűek, s az időközben megfigyelt de novo mutációkkal (49) egyetemben a gén magas mutációs rátájára utalnak. Egy mutációs „hot spot”-nak a 403-as kodon tűnik, ahol nyolc, egymástól független családban megfigyelt G-A (Arg403Gln) (47) és C-T (Arg403Trp) (11) tranzíció mellett G-T (Arg403Leu) transzverzíót is leírtak (11). Hasonlóképpen többféle mutációt figyeltek meg a 719, 741, 797 és 870-es kodonokon is.

Néhány, az eddigiektől jellegében eltérő mutációt is leközöltek, ezek patogenetikai jelentősége még nem teljesen tisztázott, de az látszik valószínűnek, hogy a molekuláris patogenezisben közvetlenül nem vesznek részt. Ezek közé tartozik egy, a gén utolsó exonját, a stop kodont, és az egész 3' UTR (nem átírózó) részt érintő 2,4 kb hosszú delécio (27); a már említett  $\alpha/\beta$ -MYH hybrid allél, s egy funkcionálisan valószínűleg null allélként működő nonszensz mutáció a gén 54-es kodonjában (33).

A MYH7 gén mutációi jelen ismereteink szerint a HCM-es esetek mintegy 30–35%-ért lehetnek felelősek.

**Genotípus-fenotípus korreláció:** Jelen adatok szerint a HCM alapjául szolgáló mutáció („genotípus”) és a kialakult betegség patomorfológiai-klinikai jellemzői („fenotípus”) között az esetek egy részében szoros kapcsolat mutatható ki. A MYH7 gén Arg403Glu mutációja pl. magas penetranciával, a hirtelen szívhalál (SCD) fokozott gyakoriságával, s kifejezett septumhypertrophiával jár.

Marian és mtsai közlése szerint egy Arg403Glu mutációt hordozó két család 20 érintett tagja közül 11 halt meg a betegség következtében, 9 hirtelen szívhalál miatt (átlagos életkoruk 33 év volt) (25). Watkins és mtsai három, Arg403Glu mutáns családot írtak le, ahol a 44 génhordozó közül 21 halt meg, ebből 9-en hirtelen szívhalál következtében, akik átlagéletkora szintén 33 év volt (47). Egy harmadik kutatócsoport által vizsgált Arg403Glu mutációt hordozó család 15 érintett tagja között 6 SCD történt, 19 és 45 éves kor között (14). Érdekességképpen egy koreai eredetű család 6 Arg403Glu mutációt hordozó tagja között viszont egy haláleset sem történt, felvetve ezzel a különböző genetikai háttér tényezők szerepét. Hasonló, „malignus” lefolyást mutatnak a MYH7 gén Arg719Trp, valamint az Arg453Cys (47) mutációi is.

A „malignus” MYH7 mutációkkal szemben pl. a Leu908Val mutációt alacsony penetrancia, benignus kórlefolys s az SCD ritka előfordulása jellemzi (13).

Egy közölt család 46 génhordozó családtagja között mindössze 2 haláleset fordult elő, s a 60 éves életkorra kivetített kumulatív túlélési arány 92% volt. Hasonlóan jó prognózisú a Gly256Glu mutáció, mintegy 2%-os SCD aránnyal 50 éves életkorig (14). A Val606Met mutáció szintén benignus lefolyású volt 3 kisebb és egy nagyobb családban, ahol összesítve 30 génhordozó közül mindössze ketten haltak meg (26, 47). Fananapazir és mtsai azonban közöltek egy családot, ahol a Val606Met mutáció a HCM súlyos klinikai manifesztációjával és az SCD halmozott előfordulásával társult (14). Mindezek az

eredmények jól mutatják, hogy még számos adatnak kell összegyűlnie ahhoz, hogy a genotípus-fenotípus korrelációkról árnyaltabb képünk legyen.

#### $\alpha$ -tropomyozin gén (TPM1, 15q22)

Két német HCM-es családban, melyben kizárható volt a MYH7 gén érintettsége, „linkage mapping”-gel a 15-ös kromoszóma hosszú karjára (15q2) lokalizálták a betegséget okozó gén helyét (41). Amikor a szintén sarcomer fehérjét kódoló  $\alpha$ -tropomiozin gént a 15-ös kromoszóma hasonló régiójára lokalizálták, nyilvánvaló célpont lett a további vizsgálatokhoz, amik ki is mutatták a gén két, különböző pontmutációját a két családban (Asp175Asn, Glu180Gly) (42).

Az irodalomban azóta még további két európai (8) és három japán (50) HCM-es családot közöltek, amelyekben az  $\alpha$ -tropomiozin gén a mutáns. Az Asp175Asn mutációt ezek közül három európai és egy japán, egymással biztosan nem rokon családban is kimutatták, ami az adott kodon hipermutabilitására utal. Ugyanezen kodon de novo mutációját is bizonyítani lehetett egy családban (43). Jelen adatok szerint ez a mutáció teljes mértékben penetráns. Az TPM1 mutációk a HCM-es esetek kb. 5%-át okozhatják.

Az  $\alpha$ -tropomiozin fehérje a miofibrillum vékony filamentumának alkotórésze, a head-to-tail formában elrendezkedő  $\alpha$ -tropomiozin dimerek az aktin filamentum barázdaiban helyezkednek el, hét aktin monomert áthidalva. Az  $\alpha$ -tropomiozin fehérjelánc 150–180-as aminosav pozíciójából álló domén azon két feltételezett hely egyike, ahol az  $\alpha$ -tropomiozin a troponin komplexhez kötődik. Ezt a helyet érintő mutációk (Asp175Asn, Glu180Gly) valószínűleg a fehérje  $\text{Ca}^{++}$ -dependens troponin T kötőhelyét károsítják. Nem tudni, hogy a szívizomzatban kívül más szövetekben is megtalálható  $\alpha$ -tropomiozin mutációi miért okoznak csak szívspecifikusnak tűnő fenotípust, lehet, hogy a gén érintett 5-ös exonja csak a szívizomzatban kritikus funkciójú.

**Genotípus-fenotípus korreláció:** Az eddig leírt  $\alpha$ -tropomiozin mutációt hordozó betegek széles morfológiai spektrumúak. A három összehasonlított európai család tagjaiban különböző súlyosságú és lokalizációjú szívhypertrophiát találtak, az enyhe szívhypertrophiától (septumvastagság:  $15 \pm 2,7$  mm) a súlyos szívhypertrophiáig (septumvastagság:  $24 \pm 4,5$  mm). Mindhárom családban azonban „benignus” volt a betegség, az összesen 21 beteg 85%-ának nem, vagy enyhe tünetei voltak; mindössze ketten haltak meg a családtagok közül (8). Ezzel szemben a japán  $\alpha$ -tropomiozin mutációt hordozó családokban, köztük az azonos, Asp175Asn mutációt hordozóban is, malignusnak bizonyult a HCM lefolyása: különösen gyakori volt a hirtelen szívhalál és a dilatatív fázisba átmenő HCM (50).

#### Troponin T gén (TNNT2, 1q3)

Az  $\alpha$ -tropomiozin mutáció felfedezése a sarcomer más, vékony filamentum felépítésében részt vevő fehérjéket kódoló gének mutációját is valószínűsítette. Mielőtt magának a troponin T génnek (TNNT2) lokalizációja ismeretté vált volna az 1-es kromoszóma hosszú karján (1q3), „linkage mapping”-gel már három családban bizonyították ezen régió érintettségét (45). Jelenleg több, mint tíz, HCM-et okozó mutáció ismert a TNNT2 génen (15, 31, 42, 46). Legtöbbjük missense pontmutáció, valamint egy 3 nukleotidból álló delécio (46), ill. egy, a fehérje terminális 22 aminosavának deléciójával járó, ún. „splice site” (az RNS splicing-ot módosító) mutáció is



ismert (46). TNNT2 mutációkat minden rasszban észleltek már (Európa, Észak-Amerika, Japán, Kína, Délkelet-Ázsia, Pakisztán, Dél-Afrika) (46). A TNNT2 génmutációk a HCM-es esetek kb. 15%-áért lehetnek felelősek.

A troponin T fehérje a miofibrillum vékony filamentumának, a troponin komplexumnak része. A TNNT2 gént érintő mutációk a fehérje kritikus, az evolúció során megőrzött aminosavainak szubsztitúcióján keresztül annak vitális funkcióját érinthetik. Egyes pontmutációk (pl. Ile79Asn, Arg92Gln, Phe110Ile, Glu163Lys) a troponin T nem  $Ca^{++}$ -függő  $\alpha$ -tropomiozin kötődését befolyásolhatják, míg más mutációk (Glu244Asp, intron 15 G-A, Arg278Cys) a fehérje troponin C, troponin I és a  $Ca^{++}$ -dependens -tropomiozin interakcióját gátolhatják.

**Genotípus-fenotípus korreláció:** A világ különböző részeiről közölt adatok többsége szerint a TNNT2 mutációk hasonló fenotípust hoznak létre a különböző rasszokban. A TNNT2 mutációt hordozókban a szív-hypertrophia nem kifejezett, néha szubklinikus (46). A TNNT2 mutációk penetranciája kombinált, echocardiographiás és EKG kritériumok alapján kb. 75–80%, hagyományos echocardiographiás kritériumok alapján azonban igen alacsony lehet (40%). A HCM lefolyását tekintve a TNNT2 mutációk a malignus MYH7 mutációkhoz hasonlóan kifejezetten malignusak: rossz prognózissal és a hirtelen szívhalál kifejezett kockázatával járnak (31, 46).

Ennek ellenére egy Arg102Leu TNNT2 mutációt hordozó francia családban – ahol széles spektrumú szívhypertrophia és a mutáció komplett penetranciáját észlelték –, a családtagok közül senki sem halt meg hirtelen szívhalálban (15).

#### *Myozinkötő fehérje gén (MYBPC, 11q11.2)*

Linkage analízissel már 1993-ban bizonyították egy további HCM lókuszt jelenlétét a 11-es kromoszómán (11p11.2) (5), melyen 1995-ben a miozinkötő C fehérjét (myosin binding protein C, MYBPC) kódoló génen azonosítottak mutációkat HCM-es családokban.

Egy családban a gén egy részleges, 18 bázispárból álló duplikációját találták (44), mely a mutáns fehérjét 6 aminosavval meghosszabbította. Másik három családban a fehérje korai terminációját okozó és csonka fehérjét eredményező „splice site” mutációt írtak le (2, 44). A fenti mutációk mindegyikéről feltételezhető volt, hogy a fehérje C terminális, miozin kötődésért felelős részét károsítják. További vizsgálatok igen heterogén, s a többi HCM gén mutációtól jellegében eltérő mutációkat – további „splice site” mutációkat, egy pentanukleotid deléciót és egy missense mutációt – írtak le HCM-es betegekben (4, 32). A MYBPC mutációk a HCM-es esetek kb. 15%-át hozhatják létre.

A miozinkötő C fehérje a sarcomer domináns miozinkötő fehérjeje, s mivel csak a szívben expresszálódik, mutációja érthetően csak szívspecifikus fenotípushoz vezet. A MYBPC a sarcomerben transzverz módon helyezkedik el, a vastag filamentumban miozinhoz kötődik, az elasztikus komponensben pedig egy titinnek nevezett fehérjéhez. Strukturális szerepén túl valószínűleg regulatorikus funkciója is van: F-aktinnal és a miozin feji részével való interakciója a miozin ATP-át modulálja, reverzibilis foszforilációja pedig a kontrakció adrenérg regulációjában tűnik fontosnak. A fent részletezett mutációk a MYBPC fehérje konzervált C terminális, magas

miozinkötő affinitású részének csonkításával, a miozinhoz való kötődés gátlásával hozhatják létre a HCM-et (2, 44).

**Genotípus-fenotípus korreláció:** A MYBPC gén esetében részletes adatok a genotípus-fenotípus összefüggésekről még nem állnak rendelkezésre. Úgy tűnik, hogy a MYBPC mutációk korfüggő penetranciát mutatnak, s 40 éves kor alatt a betegség penetranciája igen alacsony ( $\approx 45\%$ ) is lehet (6, 32). A MYBPC mutációk által okozott HCM benignusnak tűnik, enyhe bal kamrai hypertrophiával és jó prognózissal, különösen fiatal korban (6).

#### *Esszenciális miozin könnyű lánc gén (MYL3, 3p21.31)*

Más, szintén sarcomer fehérjéket kódoló gének mutációi után kutatva, Poetter és mtsai az esszenciális miozin könnyű lánc gén (MYL3) pontmutációját találták egy HCM-es családban (Met149Val) (34). A család 13 érintett tagja közül hatban a HCM egy igen ritka, midventrikuláris obstrukcióval jellemzett formáját észlelték. Hasonló morfológiájú eseteket vizsgálva a MYL3 gén egy további pontmutációját fedezték fel egy fiatal HCM-es fiúban (Arg154His).

#### *Regulatorikus miozin könnyű lánc gén (MYL2, 12q24.21)*

Az esszenciális miozin könnyű lánc mellett elhelyezkedő regulatorikus miozin könnyű lánc génjét (MYL2) vizsgálva, három pontmutációt találtak izolált HCM-es esetekben (Ala13Thr; Glu22Lys; Pro94Arg) (34). A HCM-es betegek a MYL3 mutációk megjelenéséhez hasonló, midventrikuláris HCM-ben szenvedtek. A MYL2 gén mutációját egy karib HCM-es családban leírták (Phe18Leu) (19), de ezekben a betegekben nem észlelték midventrikuláris obstrukciót (WJ McKenna, személyes közlés).

Mind az esszenciális, mind a regulatorikus miozin könnyű lánc fehérje a miozin nehéz lánc globuláris fejeének distalis regulatorikus doménjéhez kötődik, stabilizálja a feji rész hosszú, alfa helikális fehérjeláncát. A regulatorikus könnyű lánc egy foszforiábilis serint tartalmaz, és ismert módon regulálja a simaizom és nem izom eredetű miozin ATP-áz aktivitását, de harántcsikolt izomzatban csak modulatív szerepe ismert.

#### *Troponin I gén (TNNI3, 19p11)*

Szintén a fenti „kandidáns gén” megközelítést használva, egy japán kutatócsoport a troponin I gén (TNNI3) mutációt találta japán HCM-es betegekben (22).

A gén 7-es és 8-as exonjában 5 pontmutációt és egy trinukleotid deléciót észlelték, melyek az evolúció során megőrzött aminosavakat érintették, és többnyire együtt öröklődtek a betegséggel, bár de novo mutációt is találtak. Két pontmutáció (Arg162Trp; Gly203Ser) az eddig „japán típusú”-ként ismert, apikális HCM képében manifestálódott. Az apikális HCM heterogén voltát jól illusztrálja az is, hogy TNNI3 mutációt nem csak apikális HCM-ben találták és más gének mutációit és észlelték apikális HCM hátterében.

#### *Modifikátor gének HCM-ben*

Az a tény, hogy a HCM klinikai-morfológiai megjelenése a különböző rasszokban és azonos családon belül is különböző lehet, még azonos mutációk esetében is, modifikátor tényezők szerepét veti fel, melyek között valószínűleg nagy szerepet játszanak a genetikai tényezők (a „genetikai háttér”) bizonyos modifikátor géneken keresztül.

Ilyen modifikátor szerepet tulajdonítanak a renin-angiotenzin rendszer (RAS) komponenseinek, többek között az angiotenzin I konvertáló enzimnek (ACE),

2. táblázat: A HCM módosított diagnosztikus kritériumai HCM-es betegek felnőtt családtagjaiban (30).

1) Echokardiográfia alapján	Major kritériumok	Minor kritériumok
BK falvastagsága: az anterior septumnál vagy a hátsó falnál:	≥ 13 mm	= 12 mm
a posterior septumnál vagy a laterális falnál:	≥ 15 mm	= 14 mm
SAM:	súlyos (közvetlen billentyű-septum kontaktus)	enyhe (nincs közvetlen billentyű-septum kontaktus) redundáns mitralis billentyű vitorlák
2) Elektrokardiográfia alapján	Major kritériumok BK hypertrophia + repolarizációs eltérések (Romhilt és Estes szerint)  T hullám inverzió: ≥ 3 mm: I-aVL (QRS-T hullám tengelykülönbsége ≥ 30 fok) ≥ 3 mm: V3–V6 ≥ 5 mm: II–III-aVF  abnormális Q hullám (> 40 ms vagy > 1/4 R hullám) legalább két elvezetésben az alábbiak közül: – I–III-aVF (BAH hiányában) – V1–V4 – I-aVL–V5–V6	Minor kritériumok komplett bal-Tawara szár block vagy minor intraventrikuláris vezetési zavar a BK elvezetésekben minor repolarizációs eltérések a BK elvezetésekben  mély S hullám V2-ben (> 25 mm)  + ismeretlen eredetű mellkasi fájdalom, dyspnoe vagy syncope

BK = bal kamra; SAM = systolic anterior motion; BAH = bal anterior hemiblock

melynek számos cardiovascularis hatásán túl közvetlen proliferatív hatása is ismert a szívizomzatban. Az enzimet kódoló gén egy inzerció/delécio (I-D) polimorfizmust hordoz; a gén ezen polimorfizmusa és az ACE plazmaszintje között közvetlen összefüggést mutattak ki: a D-D genotípusú emberek szérum ACE szintje mintegy kétszerese az I-I genotípusúakénak.

Kimutatták, hogy gén D-D genotípusa HCM-es betegekben szignifikánsan nagyobb bal kamrai tömegindexszel és bal kamra hypertrophiával jár (23), és a hirtelen szívhalál kockázata is nagyobb (28). Hasonló összefüggést írtak le az angiotenzinogént kódoló gén egy polimorfizmusával kapcsolatban is (18). Egy francia tanulmány azt mutatta, hogy a fenti összefüggések mutációspecifikusak, s a D-D genotípus korrelálása az adverz klinikomorfológiai paraméterekkel csak bizonyos mutációk esetében igaz (40).

Saját vizsgálataink a miotonin-kináz gén modifikátor szerepét valószínűsítették HCM-ben (37). Ez a gén egy cAMP dependens protein-kinázt kódol, s mutációja az egyik leggyakoribb felnőttkori izomdystrophiát, a dystrophia myotonicát okozza.

Klinikai vonatkozások

A fenti genetikai ismeretek már napjainkban is jelentős hatással vannak a HCM klinikai megközelítésére. Bár a genetikai rutindiagnosztika megteremtése és még inkább a génterápia kidolgozása a jövő kihívásai közé tartoznak, a HCM-es betegek gondozásában a következő szempontokat mindenféleképpen érdemes figyelembe venni:

1. Mivel a HCM az esetek többségében öröklődő, familiáris betegség, erről a tényről a HCM-es betegeket fel kell világosítani, részletes családi anamnézist (családfa) kell felvenni, s az elsőági vérrokonok (szülők, testvérek, gyermekek) részére klinikai szűrővizsgálatot kell felajánlani.

A szűrés során anamnéziszfelmérés, fizikális vizsgálat, 12 elvezetéses EKG, transzthoracicus echokardiográfia kell, hogy történjen. Pozitív szűrési eredmény esetén a klinikai kivizsgálást mérlegelni kell, és rizikóbecslést tanácsos végezni (24–48 órás Holter-vizsgálat, terheléses vizsgálat stb.).

2. Ismert, hogy a mutációhordozó családtagok, annak ellenére, hogy genetikailag érintettek, gyakran nem felelnek meg hagyományos, klinikai diagnosztikai kritériumoknak. A HCM (familiaritás esetén) autoszomális domináns módon öröklődik, s így egy HCM-es beteg elsőági vérrokonának 1 : 1 az esélye arra, hogy örökölje a HCM-et okozó génmutációt, szemben az általános populációt „fenyegető” 1 : 500–1000 esélyhez. Ez a gyakorlatra úgy fordítható le, hogy egy familiáris HCM-es beteg valamelyik szülőjének génhordozónak kell lennie, s mind testvérei, mind gyermekei 50%-a hasonló módon örökölte a domináns mutáns gént. Mivel a vérrokonok érintettségének kockázata mintegy 500–1000-szerese a normál populációénak (1 : 1 esély vs. 1 : 500–1000 esélyhez) a vizsgálatuk során észlelt, aspecifikusnak vagy nem diagnosztikusnak tartható eltéréseknek sokkal nagyobb jelentőséget kell tulajdonítani. A fenti megfontolások és genotipizált betegek-hozzá tartozók vizsgálata alapján



McKenna és mtsai HCM-es betegek rokonainak klinikai megítélésére módosított diagnosztikus kritériumokat ajánlanak (2. táblázat) (30). Megkülönböztetnek major és minor echokardiográfiás és EKG kritériumokat; diagnosztikusnak egy major (echo vagy EKG) két minor echo, vagy egy minor echo és két minor EKG kritérium meglétét értékelik. A fenti diagnosztikus kritériumok felnőttekre vonatkoznak csak, s a HCM diagnózisa más, potenciálisan szívhypertrophiát okozó eltérések esetén (sportolók, kontrollált hypertensio, obesitas stb.) továbbra is problematikus marad.

A fenti kritériumok nagyszámú, genotipizált HCM-es beteg és hozzátartozóik klinikai vizsgálatán alapulnak (7), mely szerint mind a major echo és major EKG kritériumok kiváló specificitásúak (100%, ill. 97%), bár alacsonyabb szenzitivitásúak (62%, ill. 61%). A minor kritériumok kombinálásával a szenzitivitást lehet növelni 83%-ra, s így a módosított diagnosztikus kritériumok negatív prediktív értéke 95% 30 éves kor felett. Mindazonáltal az „egészséges” génhordozók (a mutáns gént öröklő, de mindenféle echo/EKG eltérés nélküli családtag) továbbra is jelentős hányadot, 17–20%-ot tesznek ki, ezek klinikai megítélése továbbra is nehézséget jelent.

3. Eddigi ismereteink szerint egy adott HCM mutáció prognosztikailag jelentős lehet, s ezért érdemes törekedni a genetikai diagnózis – akár jövőbeni – elérésére. A HCM genetikai diagnosztikája (az adott mutáció azonosítása), bár metodikailag megoldott, jelenleg még igen idő- és költségigényes, és a rutin diagnosztikában még sehol sem hozzáférhető.

Mindazonáltal a mutációk azonosítása a HCM genetikájával foglalkozó kutatólaboratóriumokban általában elérhető (Magyarországon a Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikáján folynak hasonló vizsgálatok), ezért a HCM-es betegektől vérminta levétele, s annak tárolása egy esetleges genetikai vizsgálatra indokolt lehet. Mindenesetre a molekuláris genetikai vizsgálatot alapos klinikai családvizsgálatnak kell megelőznie.

## Konklúzió

A legutóbbi évek genetikai kutatásai a hypertrophiás cardiomyopathia hátterében hét gén mutációját azonosították és etiológiai alapon redefiniálták a HCM-et a sarcomer betegségeként. Az eredmények kétségtelenül impresszívok, de mint minden új felfedezés, ez is számos nyitott kérdést szült, melyek még megválaszolásra várnak.

Nem tudjuk, hogy mely további gén/ek mutációi okozhatnak HCM-et, s ezek mind valóban sarcomer fehérjét kódolnak-e. Nem tisztázott részleteiben a molekuláris patomechanizmus, az a folyamat, amelyen keresztül az örökölt mutáns gén létrehozza a klinikai fenotípust, a megjelenő betegséget. Nem ismertek azok a faktorok, amelyek a mutáció kifejeződését befolyásolják, és hogy mi a pontos korreláció a genotípus és a fenotípus között. Mindez csak néhány a megválaszolatlan kérdések közül.

A legfontosabb természetesen az, hogy a fenti eredmények végül is milyen mértékben épülnek be a HCM-es betegek klinikai diagnosztikájába, terápiájába, rizikóbecslésébe, utánkövetésébe. Az eddigi rendelkezésre álló

eredmények mindenesetre már elég alapot szolgáltatnak ahhoz, hogy a HCM-ről kialakult felfogásunkban és annak klinikai megközelítésében a genetikai ismeretek teret nyerjenek.

A publikáció a T019612 sz. OTKA és a magyar–görög kormányközi tudományos és technológiai együttműködés keretében, az OMFB és külföldi szerződéses partnere, a Ministry of Development, GSRT támogatásával (GR-48/96) jött létre.

**IRODALOM:** 1. Bennett, C. P. B., Moore, G.: Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in the Northern region of England. *J. Med. Genet.*, 1987, 24, 242. – 2. Bonne, G., Carrier, L., Bercovici, J. és mtsai: Cardiac myosin binding protein-C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Genet.*, 1996, 11, 438–440. – 3. Brown, B. D., Scheffold, T., Rottbauer, W. és mtsai: Intermediate filament desmin gene missense mutation found in a family suffering from hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, Supplement I, 1995, 92, I-233. – 4. Carrier, L., Bonne, G., Barend, E. és mtsai: Organization and sequence of human cardiac myosin binding protein C gene (MYBPC3) and identification of mutations predicted to produce truncated proteins in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ. Res.*, 1997, 80, 427–434. – 5. Carrier, L., Hengstenberg, C., Beckmann, J. S. és mtsai: Mapping of a novel gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 11. *Nature Genet.*, 1993, 4, 311–313. – 6. Charron, P., Carrier, L., Bonne, G. és mtsai: The onset of the disease is delayed in familial hypertrophic cardiomyopathy related to cardiac myosin binding protein C gene. *Circulation*, 1997, 96, 1–645. – 7. Charron, P., Dubourg, O., Desnos, M. és mtsai: Diagnostic value of electrocardiography and echocardiography for familial hypertrophic cardiomyopathy in a genotyped adult population. *Circulation*, 1997, 96, 214–219. – 8. Coviello, D. A., Maron, B. J., Spirito, P. és mtsai: Clinical features of hypertrophic cardiomyopathy caused by mutation of a „hot spot” in the alphasarcomeromyosin gene. *J. Am. coll. Cardiol.*, 1997, 29, 635–640. – 9. Csanády, M., Hógye, M., Forster, T.: Hypertrophic cardiomyopathy associated with congenital deaf-mutism. *Eur. Heart J.*, 1987, 8, 528–534. – 10. Cuda, G., Perotti, N., Perticone, F. és mtsai: A previously undescribed de novo insertion-deletion mutation in the beta myosin heavy chain gene in a kindred with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Heart*, 1996, 76, 451–452. – 11. Dausse, E., Komajda, M., Fétler, L. és mtsai: Familial hypertrophic cardiomyopathy. Microsatellite haplotyping and identification of a hot spot for mutations in the beta-myosin heavy chain gene. *J. Clin. Invest.*, 1993, 92, 2807–2813. – 12. Emanuel, R., Withers, R., O'Brien, K.: Dominant and recessive modes of inheritance in idiopathic cardiomyopathy. *Lancet*, 1971, 2, 1065–1067. – 13. Epstein, N. D., Cohn, G. M., Cyran, F. és mtsai: Differences in clinical expression of hypertrophic cardiomyopathy associated with two distinct mutations in the beta-myosin heavy chain gene. A 908LeuVal mutation and a 403ArgGln mutation [see comments]. *Circulation*, 1992, 86, 345–352. – 14. Fananapazir, L., Epstein, N. D.: Genotype-phenotype correlations in hypertrophic cardiomyopathy. Insights provided by comparisons of kindreds with distinct and identical beta-myosin heavy chain gene mutations [see comments]. *Circulation*, 1994, 89, 22–32. – 15. Forissier, J. F., Carrier, L., Farza, H. és mtsai: Codon 102 of the cardiac troponin T gene is a putative hot spot for mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 1996, 94, 3069–3073. – 16. Geisterfer-Lowrance, A. A. T., Kass, S., Tanigawa, G. és mtsai: A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a b cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell*, 1990, 62, 999–1006. – 17. Hollman, A., Goodwin, J. F., Teare, D. és mtsai: A family with obstructive cardiomyopathy (asymmetrical hypertrophy). *Br. Heart J.*, 1960, 22, 449–456. – 18. Ishanov, A., Okamoto, H., Yoneya, K. és mtsai: Angiotensinogen gene polymorphism in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am. Heart J.*, 1997, 133, 184–189. – 19. Isnard, R., Richard, P., Flavigny, J. és mtsai: Mutation in ventricular myosin regulatory light chain in a Caribbean family with hypertrophic cardiomyopathy and hypertension. *Eur. Heart J.*, 1997, 18, 406. – 20. Ito, T., Hattori, K., Obayashi, T. és mtsai: Mitochondrial DNA mutations in car-



diomyopathy. Jpn. Circ. J., 1992, 56, 1045–1053. – 21. Jarcho, J. A., McKenna, W., Pare, J. A. és mtsai: Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1. N. Engl. J. Med., 1989, 321, 1372–1378. – 22. Kimura, A., Harada, H., Park, J.-E. és mtsai: Mutations in the troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. Nature Genet., 1997, 16, 379–382. – 23. Lechin, M., Quinones, M. A., Omran, A. és mtsai: Angiotensin-I converting enzyme genotypes and left ventricular hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. Circulation, 1995, 92, 1808–1812. – 24. MacRae, C. A., Ghaisas, N., Kass, S. és mtsai: Familial hypertrophic cardiomyopathy with Wolff–Parkinson–White syndrome maps to a locus on chromosome 7q3. J. Clin. Invest., 1995, 96, 1216–1220. – 25. Marian, A. J.: Sudden cardiac death in patients with hypertrophic cardiomyopathy: from bench to bedside with an emphasis on genetic markers. Clin. Cardiol., 1995, 18, 189–198. – 26. Marian, A. J., Mares, A. Jr., Kelly, D. P. és mtsai: Sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy. Variability in phenotypic expression of beta-myosin heavy chain mutations. Eur. Heart J., 1995, 16, 368–376. – 27. Marian, A. J., Yu, Q. T., Mares, A. Jr. és mtsai: Detection of a new mutation in the beta-myosin heavy chain gene in an individual with hypertrophic cardiomyopathy. J. Clin. Invest., 1992, 90, 2156–2165. – 28. Marian, A. J., Yu, Q. T., Workman, R. és mtsai: Angiotensin-converting enzyme polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death [see comments]. Lancet, 1993, 342, 1085–1086. – 29. Maron, B. J., Gardin, J. M., Flack, J. M. és mtsai: Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in general population of young adults: echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Circulation, 1995, 92, 785–789. – 30. McKenna, W. J., Spirito, P., Desnos, M. és mtsai: Experience from clinical genetics in hypertrophic cardiomyopathy: proposal for new diagnostic criteria in adult members of affected families. Heart, 1997, 77, 130–132. – 31. Nakajima-Taniguchi, C., Matsui, H., Fujio, Y. és mtsai: Novel missense mutation in the cardiac troponin T gene found in Japanese patient with hypertrophic cardiomyopathy. J. Moll. Cell. Cardiol., 1997, 29, 839–843. – 32. Nimura, H., Watkins, H., Bachinski, L. L. és mtsai: Mutations in human cardiac myosin binding protein C cause late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. Circulation, 1997, 96, 1–254. – 33. Nishi, H., Kimura, A., Harada, H. és mtsai: A myosin missense mutation, not a null allele, causes familial hypertrophic cardiomyopathy [see comments]. Circulation, 1995, 91, 2911–2915. – 34. Poetter, K., Jiang, H., Hassanzadeh, S. és mtsai: Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. Nature Genet., 1996, 13, 63–69. – 35. Reid, J. M., Houston, A. B., Lundmark, E.: Hypertrophic cardiomyopathy in identical twins. Br. Heart J., 1989, 62, 384–388. – 36. Richardson, P., McKenna, W., Bristow, M. és

mtsai: Report of the 1995 World Health Organization/International Task Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. Circulation, 1996, 93, 841–842. – 37. Sepp, R., Mattu, R. K., Coonar, A. S. és mtsai: Association of the myotonic kinase gene (CTG)n repeat with hypertrophic cardiomyopathy. Circulation, 1996, Abstract Supplement, I-163. – 38. Tanigawa, G., Jarcho, J. A., Kass, S. és mtsai: A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: an alpha/beta cardiac myosin heavy chain hybrid gene. Cell, 1990, 62, 991–998. – 39. Teare, D.: Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults. Br. Heart J., 1958, 20, 1–8. – 40. Tesson, F., Dufour, C., Moolman, J. C. és mtsai: The influence of the angiotensin I converting enzyme genotype in familial hypertrophic cardiomyopathy varies with the disease gene mutation. J. Mol. Cell. Cardiol., 1997, 29, 831–838. – 41. Thierfelder, L., MacRae, C., Watkins, H. és mtsai: A familial hypertrophic cardiomyopathy locus maps to chromosome 15q2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 6270–6274. – 42. Thierfelder, L., Watkins, H., MacRae, C. és mtsai: Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy; a disease of the sarcomere. Cell, 1994, 77, 701–712. – 43. Watkins, H., Anan, R., Coviello, D. A. és mtsai: A de novo mutation in alpha-tropomyosin that causes hypertrophic cardiomyopathy. Circulation, 1995, 91, 2302–2305. – 44. Watkins, H., Conner, D., Thierfelder, L. és mtsai: Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. Nature Genet., 1996, 11, 434–437. – 45. Watkins, H., MacRae, C., Thierfelder, L. és mtsai: A disease locus for familial hypertrophic cardiomyopathy maps to chromosome 1q3. Nature Genet., 1993, 3, 333–337. – 46. Watkins, H., McKenna, W. J., Thierfelder, L. és mtsai: Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. N. Engl. J. Med., 1995, 332, 1058–1064. – 47. Watkins, H., Rosenzweig, A., Hwang, D. S. és mtsai: Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy [see comments]. N. Engl. J. Med., 1992, 326, 1108–1014. – 48. Watkins, H., Thierfelder, L., Anan, R. és mtsai: Independent origin of identical beta cardiac myosin heavy-chain mutations in hypertrophic cardiomyopathy. Am. J. Hum. Genet., 1993, 53, 1180–1185. – 49. Watkins, H., Thierfelder, L., Hwang, D. S. és mtsai: Sporadic hypertrophic cardiomyopathy due to de novo myosin mutations. J. Clin. Invest., 1992, 90, 1666–1671. – 50. Yamauchi Takihara, K., Nakajima Taniguchi, C., Matsui, H. és mtsai: Clinical implications of hypertrophic cardiomyopathy associated with mutations in the alpha-tropomyosin gene. Heart, 1996, 76, 63–65.

(Sepp Róbert dr., Szeged, Pf. 480. 6701)

Kórházak, egészségügyi intézmények, tudományos társaságok  
**szakmai programjait, valamint egészségüggyel,  
 orvostudománnyal kapcsolatos pályázatok,  
 ösztöndíjak felhívásait 15 sor terjedelemig  
 térítésmentesen közöljük**

az Orvosi Hetilap előfizetői részére.

A pályázati hirdetmények ugyancsak térítésmentesek, 10 sor terjedelemig.





**V.**

# Hypertrophiás cardiomyopathiát okozó génmutáció azonosítása a béta myozin nehéz lánc génben

*Az első molekuláris genetikai analízissel igazolt magyar család leírása*

**Kulcsszavak:** hypertrophiás cardiomyopathia, béta myozin nehéz lánc gén

**Összefoglalás:** Ezidáig kilenc gén mutációját mutatták ki hypertrophiás cardiomyopathiás (HCM) betegekben, melyek közül a béta-myozin nehéz lánc gén, a troponin T gén, az alfa-tropomyozin gén és a myozin kötő C fehérje gén mutációi a leggyakoribbak. Munkánkban egy 32 éves korában hirtelen szívhalált halt HCM-es beteg és családjának klinikai és genetikai analízisét végeztük el. A probanda betegségének tünetei 12 éves korában jelentkeztek, legutolsó vizsgálatkor az aszimmetrikusan hypertrophizált septum maximális vastagsága 21 mm volt, abnormis diasztolés funkcióval, kiáramlási obstrukció nélkül. Halála úszás közben következett be. A beteg négygenerációs családjában egyik gyermeke érintettségét lehetett igazolni. A gyermek szívhypertrophiája kifejezett (septumvastagság 22 mm), EKG-ja kóros. A beteg DNS mintájában a béta-myozin nehéz lánc gén 19-es exonjának 719-es kodonjában egy G-A mutációt igazoltunk, mely aminosavszinten a normálisan jelenlevő arginin glutaminra való cseréjét okozza (Arg719Gln). A család többi tagja közül egyedül a klinikailag érintett gyermekben lehetett kimutatni a mutációt. Az igazolt béta myozin nehéz lánc gén Arg719Gln mutációja mindezt az első, magyar hypertrophiás cardiomyopathiás családban kimutatott génmutáció. A mutáció a probanda esetében 'de novo' formában jelentkezett és klinikailag malignus formában nyilvánult meg.

**Keywords:** hypertrophic cardiomyopathy, beta myosin heavy chain gene

**Summary:** To date, mutations in nine genes have been found in hypertrophic cardiomyopathy (HCM) patients, the beta myosin heavy chain gene, the troponin T gene, the alpha tropomyosin gene and the myosin binding protein C gene being the most prevalent among them. We performed a clinical and genetic analysis of a HCM family in which the proband died suddenly at the age of 32 years. The disease was diagnosed when the proband was 12 years old. On last follow up the diameter of the asymmetrically hypertrophied septum was 21 mm, with abnormal diastolic function and without outflow tract obstruction. She died while she was swimming in the swimming pool. Analysis of the proband's four-generation family showed that only one of the proband's son was clinically affected. The affected son has marked cardiac hypertrophy (interventricular septum thickness: 22 mm) and has abnormal ECG. We identified a G-A mutation in codon 719 of exon 19 of the beta myosin heavy chain gene which causes a change for glutamine instead of arginine (Arg719Gln) in the normal protein. Genetic analysis showed that apart from the proband only the clinically affected son carried the mutation. This Arg719Gln mutation of the beta myosin heavy chain gene is the first mutation identified in a Hungarian HCM family so far. The mutation occurred 'de novo' in the proband and manifested in a malignant form clinically.

## Bevezetés

A hypertrophiás cardiomyopathia (HCM) a szívizomzat primer megbetegedése, melyet típusos esetben a kamraközi septum aszimmetrikus hypertrophiája jellemez (1). A betegség prevalenciája a legfrissebb adatok szerint kb. 1:500-1000 (2), mely szerint a HCM jóval gyakoribb betegség, mint korábban gondolták. Klinikailag a betegek tünet és panaszmentesek lehetnek, de gyakrabban a panaszok jelentkezése angina, effort dyspnoe, palpitatio vagy syncope formájában. Gyakori a különböző súlyosságú ritmuszavarok jelenléte és fokozott a hirtelen szívhalál kockázata is.

Az elmúlt 10 év genetikai kutatásai azt igazolták, hogy a HCM-et a szarkómer felépítésében részt vevő fehérjéket kódoló gének mutációi okozzák. Jelen adatok szerint 9 gén, a béta myozin nehéz lánc- (14q11) (3), alfa tropomyozin- (15q22) (4), troponin T- (1q3) (4), myozin kötő C fehérje- (11p11.2) (5) (6), esszenciális (3p21.31) és regulatorikus myozin könnyű lánc- (12q24.21) (7), troponin I- (19p11) (8), alfa szívizomspecifikus aktin- (15q12) (9) és titin (2q31-32) (10) gének mutációi vezethetnek HCM-hez. Mivel fenti fehérjék a sarcomer kontrakció-relaxáció folyamatában közvetlenül vagy közvetetten részt vesznek, ezért a HCM-et jelen tudásunk szerint a sarcomer betegségének tekinthetjük. További genetikai heterogenitásra utal az a tény, hogy a vizsgált családok egy része nem köthető az eddigi ismert génekhez, tehát további gén/gének azonosítása várható a jövőben.

*Munkahely:* Szegedi Tudományegyetem, ÁOK, Szent-Györgyi A. Orvos és Gyógyszerésztudományi Centrum,

<sup>1</sup> 2. sz. Belgyógyászati Klinika és Kardiológiai Központ;

<sup>2</sup> Gyermekgyógyászati Klinika;

<sup>3</sup> Department of Biology, University of Padova, Italy;

<sup>4</sup> Department of Inherited Cardiac Diseases and Sports Medicine, University of Athens, Greece

*Levelezési cím:* Dr. SEPP RÓBERT, SZTE ÁOK II.sz. Belgyógyászati Klinika és Kardiológiai Központ, 6701 Szeged, Korányi fasor 6-10., Pf 480. E-mail: sepp@in2nd.szote.u-szeged.hu



A rendelkezésre álló adatok szerint a HCM gének közül a béta myozin nehéz lánc gén érintett a leggyakrabban, a gén mutációi a HCM-es esetek mintegy 30-35%-át okozzák. A gént érintő mutációk szinte kivétel nélkül a fehérje globuláris feji részét kódoló exonokat érintő pontmutációk (11) (12). Előzetes megfigyelések arra utalnak, hogy a béta myozin nehéz lánc gén mutációi közvetlen összefüggésben állnak a betegség klinikai lefolyásával, vagyis bizonyos mutációk „malignus” betegséget eredményeznek, súlyosabb panaszokkal és a hirtelen szívhalál fokozott kockázatával (13).

Munkánkban egy 32 éves korában hirtelen halt HCM-es beteg mutációanalízisét végeztük el. A mutációanalízis a béta myozin nehéz lánc gén Arg719Gln mutációját igazolta a gén 19-es exonjában. A beteg családjának vizsgálata azt mutatta, hogy a mutáció a betegben, de novo formában alakult ki, s átöröklődött a beteg klinikailag is érintett fiára. A mutáció az első magyar betegben igazolt HCM-et okozó génmutáció.

Anyag és módszer

**Klinikai vizsgálatok:** A betegek és hozzátartozók vizsgálatakor előzetes beleegyezés után minden esetben részletes anamnéziszfelvétel, az esetlegesen rendelkezésre álló orvosi dokumentáció áttanulmányozása, fizikális vizsgálat, 12 elvezetéses EKG és transzthoracikus echocardiográfia történt. Indokolt esetben klinikai felvételre és részletes klinikai kivizsgálásra került sor.

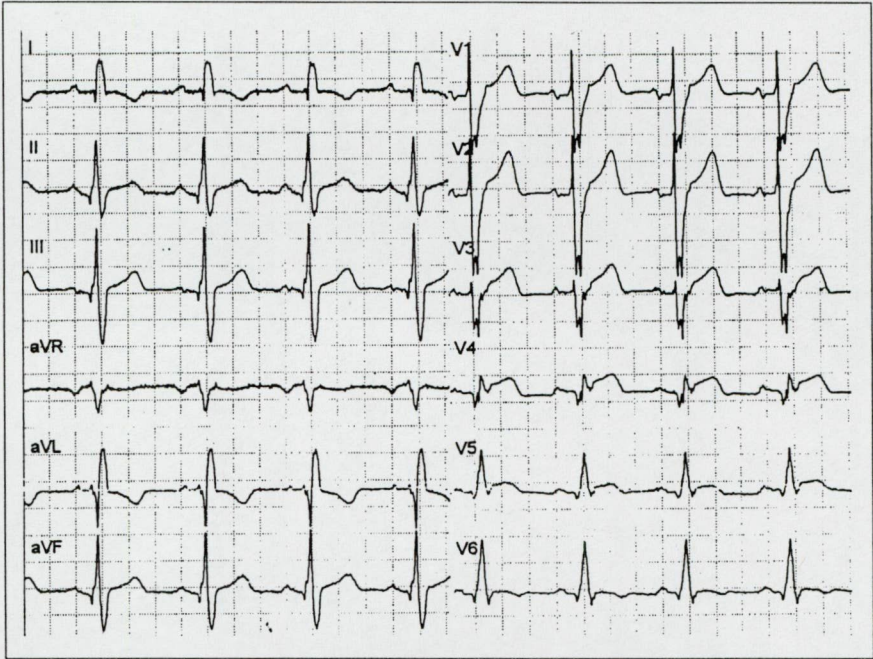
**Genetikai analízis.** A klinikai viziteken vett perifériás vérmintából DNS izolálás történt standard eljárással. A minta DNS-ekből a béta myozin nehéz lánc gén (MYH7) különböző exonjait polimeráz láncreakcióval (PCR) amplifikáltuk, az exonokra specifikus primerekkel, melyeket a MYH7 gén publikált szekvenciája alapján (GeneBank, Accession ID: X52889) terveztünk. A gén 19-es exonját az 5' TCCTACT

TCCTTCTTGCCACA 3' (forward) és 5' GCTTCTGGTGCACCCTC ATA 3' (reverse) primerekkel amplifikáltuk, 12.5 ml térfogatú PCR reakcióban, 50 ng templát DNS-t használva, az alábbi PCR protokollal: 1.5 perc kezdeti denaturáció 95 °C-on; 30 mp denaturáció 94 °C-on, 30 mp annealing 55 °C-on, 1 perc extenzio 72 °C-on, 35 cikluson keresztül, végző elongáció 5 percig 72 °C-on. A PCR produktumokat „single strand conformation polymorphism” (SSCP) analízissel vizsgáltuk, 10-15%-os, nem denaturáló poliakrylamid géleken 200 V-on, 18 órán keresztül, 5-25-37 °C-on futtatva, 5% glicerollal vagy anélkül. Az SSCP gélek vizualizálása ezüstoffestéssel történt, standard metodikák felhasználásával. Az eltérő mobilitást mutató „band”-eket klónoztuk („Original TA Cloning Kit”, Invitrogen BV, Leek, Hollandia), a gyártó ajánlásai szerint. A klónozott PCR produktumokat ABI PRISM automata szekvenálón szekvenáltuk (Perkin-Elmer Corporation, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, New Jersey, USA). A restrikciós fragmens rost hossz polimorfizmus vizsgálatot MspI restrik-

ciós endonukleázzal végeztük (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), szintén a gyártó ajánlásai szerint.

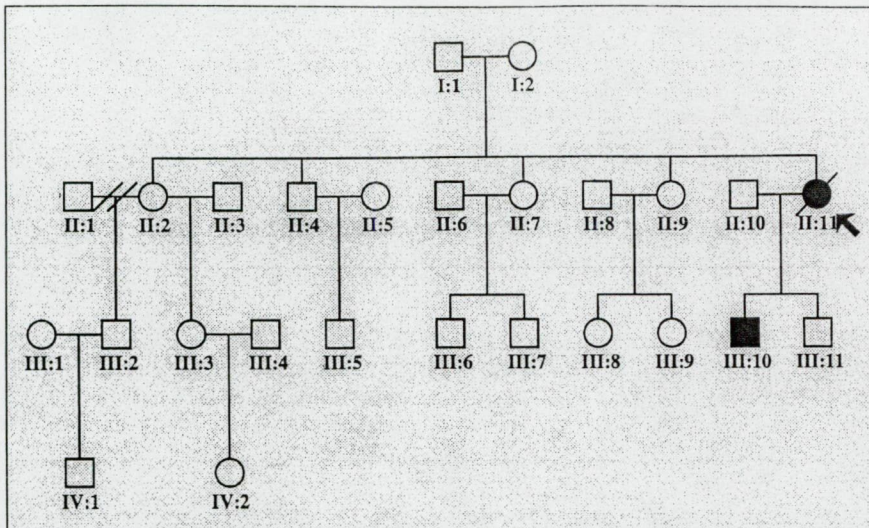
Eredmények

**A index beteg kórtörténete:** A index beteg egy nőbeteg volt, akit 12 éves korában észleltek első alkalommal a Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem (SZOTE) Gyermekklinikáján, ahova kamrai septumdefektus iránydiagnózissal került. EKG vizsgálata sinus ritmust, bal kamra hypertrophiát ill. bal kamrai repolarizációs zavart mutatott. Szívkatéterezése a VSD fennálltát kizárta, s echocardiographiás vizsgálata a későbbiekben aszimmetrikus septum hypertrophiát (ASH) igazolt. Béta blokkoló kezelés mellett stabil klinikai állapotban volt, ideiglenesen jelentkező effort dyspnoes, szédülés és palpitationnal járó panaszok miatt időnkénti hospitalizációkra került sor, de eszméletvesztés, thromboemboliás szövődmény vagy kifejezett dekompenzációra utaló tünetek nem jelentkeztek követése



1. ábra. Az index beteg 12 elvezetéses EKG felvétele, mely sinus ritmust, septalis hypertrophiát, nem specifikus intraventricularis vezetési zavart, V1-5 elvezetésekben ST elevatiót mutat.



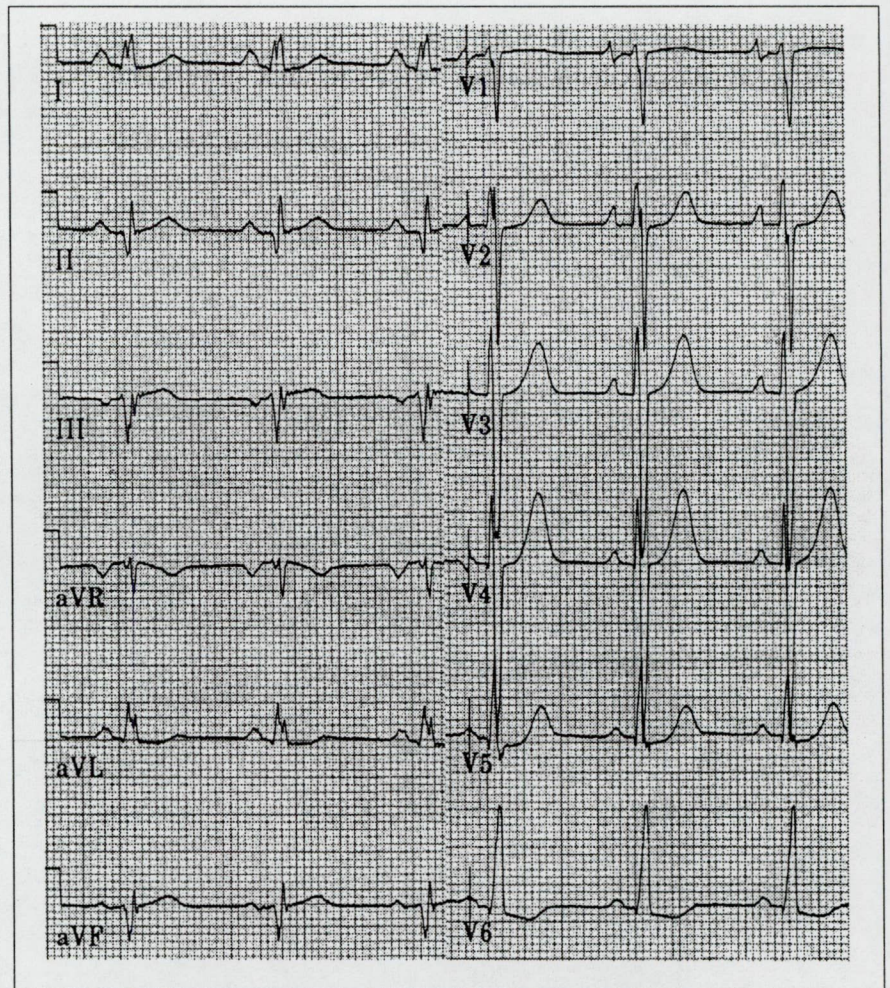


2. ábra. A vizsgált család négygenerációs családfája. A férfiakat négyzet, a nőket kör jelöli, a klinikailag egészséges családtagokat üres, a betegeket kitöltött szimbólum reprezentálja. Az index betegre (II:11) nyíl mutat.

során. 24 órás ambulanter Holter monitorozása 1%-ot elérő kamrai extrasystoliát, néhány kapcsolt VES-t mutatott, de major kamrai ritmuszavart nem lehetett detektálni. Utolsó ambulanter kontrolljakor (1996, 31 éves korában) EKG-ján sinus ritmus, septális hypertrophia, nem specifikus intraventricularis vezetési zavar szekunder repolarizációs eltérésekkel, valamint V1-5 elvezetésekben ST elevatio látszott (1. ábra). Echocardiographiás vizsgálata típusos ASH-t (parasternális hossztengetlyi metszeten mérve interventrikularis septum vastagság: 21 mm, bal kamra hátsó fal vastagság: 9 mm), kissé nagyobb bal pitvart (bal pitvari átmérő: 43 mm), normális bal kamrai paramétereket (bal kamrai végdiastoles átmérő: 55 mm, bal kamrai végsystoles átmérő: 40 mm), normális bal kamrai systoles funkciót (bal kamrai ejekciós frakció: 52%), abnormis bal kamrai relaxációt (E/A: 48/68) és jelzett mitrális insufficienciát mutatott. Bal kamrai kifolyó traktus obstrukció vagy 'systolic anterior motion' (SAM) jelenség nem volt látható. Egy évvel később uszodában való úszás közben hirtelen eszméletét veszítette, keringése, légzése leállt, intézetbe való szállításakor alacsony frekvenciájú kamr fibrillatiót, fénymerev pupillákat észleltek, a re-

animációs kísérlet eredménytelen maradt.

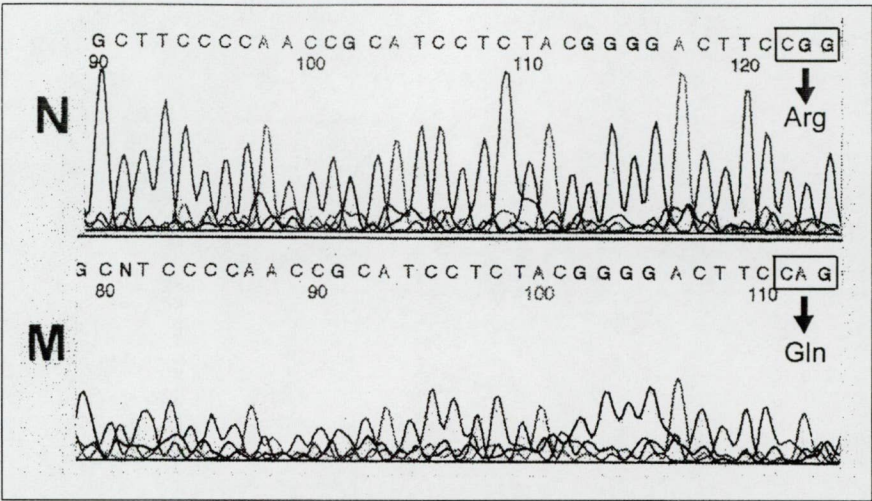
**Családszűrési eredmények:** A index beteg egy jelenleg négygenerációs családból származott, melynek családfája az 2. ábrán látható. A család minden tagja, összesen 14 személy, részt vett a családszűrő vizsgálaton. A index beteg szüleinek (I:1; I:2) kardiális panaszai nem voltak, EKG-juk normális volt, echocardiographiás vizsgálatuk enyhe, koncentrikus bal kamra hypertrophiát igazolt, feltételezhetően a több éve fennálló mérsékelt hypertonia következményeként. A index beteg négy testvérének és azok gyermekeinek kardiális panaszai ill. tüneteik nem voltak, EKG-juk és echocardiogram-



3. ábra. Az klinikailag érintett 8 éves gyermek 12 elvezetéses EKG felvétele, mely sinus ritmust, biatriális terhelést, bal kamra hypertrophiát, bal kamrai strain, inferior elvezetésekben pathológiás Q hullámot mutat. Papírsebesség 25 mm/s, 5 mm/mV hitelesítéssel.



juk negatív volt. A index beteg két fiúgyermeke közül az egyiknél (III:10) 2 éves korában a SZOTE Gyermekklinikáján szintén HCM-et állapítottak meg, akkori leletei szerint fizikális statusában bal parasternális II-IV bordaközben 2/6-os erősségű systoles zörejt lehetett hallani, EKG-ján sinus ritmust, balra deviáló R tengelyt, mindkét kamra hypertrophia és terhelés jeleit lehetett látni, echóján a septum jelentős megvastagodásával. A panaszmentes gyermeknél 4 éves korában klinikai statusrevizióra került sor, mely során echocardiogramján hypertrophiás jobb és főleg bal kamrát, igen kifejezett septum hypertrophiát (septumvastagság: 21 mm, hátsó fal: 7.1 mm), bal kamrai diastoles funkció zavart, SAM jelenséget láttak, béta blokkoló terápiát indítottak. Terhelhetősége mindvégig alacsony volt, terhelésre nehézlégzés ill. minimális ajakcyanozis jelentkezett. Követése során többször került sor hospitalizációra részben recidív obstruktív bronchitis és bronchopneumonia valamint kardiális statusa miatt, ezek során therapiájába fokozatosan Ca csatorna blokkolót és vízhajtót építettek be. Jelen ambulanter vizs-

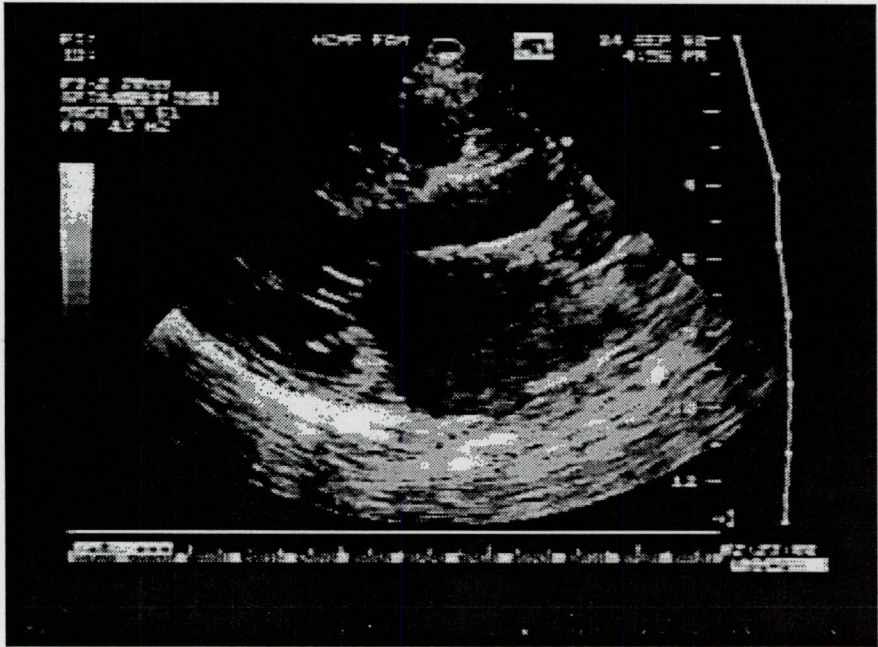


5. ábra. A MYH7 gén 19-es exonjának szekvenciaanalízise az index beteg (M) és egy normális kontroll mintában (N). A szekvenálás eredménye egy G-A tranzíciót mutat a gén 13463-as pozíciójában, mely a 719-es kodon arginint kódoló CGG kódját glutamint kódoló CAG-re változtatja.

gálatakor (8 éves korában) EKG-ján sinus ritmust, balra deviáló R tengelyt, mindkét pitvari terhelést, és bal kamra hypertrophiát észleltünk, pathológiás Q hullámokkal inferior elvezetésekben (3. ábra). Echocardiographiás vizsgálata a hátsó és posterior falak kivételével valamennyi bal kamrai szegmens és a jobb kamra kifolyótraktusának hypertrophiáját mutatta, legkifejezetteben a septum

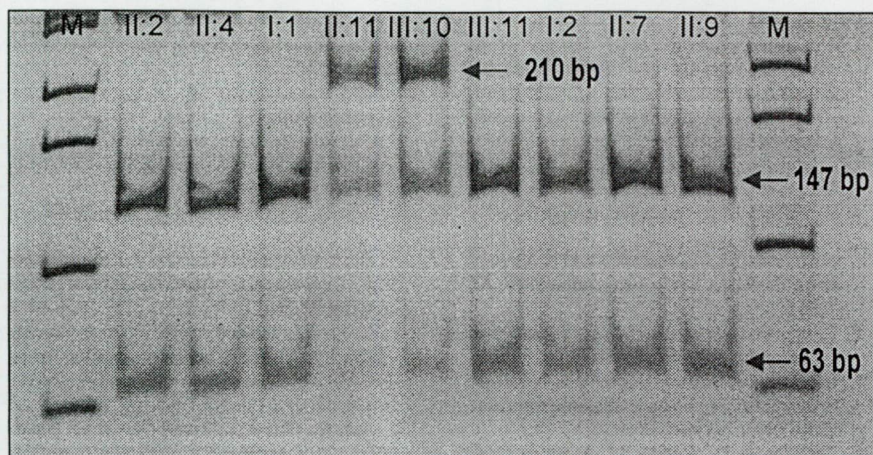
közepén (interventrikularis septum vastagság: 22 mm, bal kamra hátsó fal vastagság: 6 mm), ezen kívül tág bal pitvart (bal pitvari átmérő: 48 mm), tág bal kamrai paramétereket (bal kamrai végdiastoles átmérő: 56 mm, bal kamrai végsystoles átmérő: 31 mm), jó globális bal kamrai systoles funkciót (bal kamrai ejekciós frakció: 68%), feltehetőleg pseudonormális bal kamrai diastoles funkciót (E/A: 50/33) és egyes fokú mitrális insufficienciát mutatott (4. ábra). 24 órás Holter monitoros vizsgálata kórosat nem igazolt. Futószőnyeges terheléses vizsgálatánál alacsony terhelhetőséget (2 MET) és hypotenzív vérnyomásválaszt észleltünk. A index beteg másik fiúgyermeke klinikailag egészségesnek bizonyult.

**Genetikai vizsgálatok:** A index beteg mintájának SSCP vizsgálatakor egy eltérő mobilitású band-et észleltünk a béta myozin nehéz lánc gén (MYH7) 19-es exonjában. A PCR produktum szekvenálása a gén 13463-as pozíciójában egy G-A tranzíciót mutatott (5. ábra). A mutációt az ellenirányú szál szekvenálásakor is igazolni lehetett. A mutáció a gén 719-es kodonját érinti, s az itt lévő arginint kódoló CGG kodont glutamint kódoló CAG-re változtatja (Arg719Gln). A mutáció az itt normálisan meglévő MspI restriktációs



4. ábra. Az érintett 8 éves fiú echocardiogramja aszimmetrikus septum hypertrophia képével, megnagyobbodott bal pitvarral. A pontos paramétereket lsd. a szövegben.





6. ábra. A MYH7 gén 19-es exonjának MspI restrikciós fragmens analízise a családtagokban. A mutáns mintában a restrikciós hely elvesztése miatt az eredeti (210 bp) hosszúságú, emésztetlen és két emésztett, rövidebb (147 ill. 63 bp) fragmens látható, míg a kontrollokban az érintetlen restrikciós helyek miatt csak emésztett fragmensek láthatóak. A minták közül a II:11-es (proband) és a III:10-es (a klinikailag érintett fiúgyermek) mintában lehet megfigyelni a mutációt jelző restrikciós mintát, míg a többi minta, az I:1 (a beteg apja) és I:2 mintával (a beteg anyja) együtt, normális restrikciós mintát mutat. M: molsúly marker, bp: bázispár.

helyet is érinti, a restrikciós hely eliminálásával. Mindezek alapján a mutációt restrikciós endonukleáz emésztéssel (RFLP) is bizonyítani lehetett (6. ábra). Az RFLP analízis alapján a beteg heterozigóta volt a mutáció jelenlétére, egy normális és egy mutáns allélt hordozva. Hasonló eltérést nem találtunk további száz, nem rokon kromoszóma vizsgálatakor.

A család genetikai analízisekor az index beteg mellett csak a klinikailag érintett fiú (III: 10) mintájában észleltük a mutációt (6. ábra), hasonlóan heterozigóta formában. Mivel sem az anya (I:2), sem az apa (I:1) mintája nem hordozta a mutációt, polimorf markerekkel a paternalitást is megvizsgáltuk, melyek azt bizonyították.

## Megbeszélés

Munkánkban a béta myozin nehéz lánc gén 19-es exonjának Arg719 Gln mutációját találtuk hypertrophiás cardiomyopathiás betegünk betegségé hátterében. A mutációt a klinikailag érintett gyermekében is ki lehetett mutatni, míg klinikailag

egészséges hozzátartozói nem hordozták a mutációt. Mindez azzal együtt, hogy a mutáció további száz egészséges kromoszómán sem volt kimutatható, a mutáció kóroki szerepét valószínűsíti. Mivel a mutációt szüleiben nem lehetett igazolni, ez a mutáció „de novo” eredetűre (újjonnan keletkezésére) utal. Mindeztáig ez az első, magyar HCM-es betegben kimutatott génmutáció.

A béta myozin nehéz lánc gén (MYH7) mutációja a HCM egyik leggyakoribb oka, az esetek mintegy 30-35%-ért lehet felelős. A gén első mutációját 1990-ben igazolták HCM-es betegekben (3), azóta több, mint 50 mutációt azonosítottak a génben. A MYH7 gént érintő mutációk szinte kivétel nélkül pontmutációk, melyek a gén első 23 exonját érintik, a gén azon részét, mely a protein globuláris feji, ill. csuklószerű köztes részét kódolják (11) (12). Klinikai megjelenésüket tekintve a MYH7 gént érintő mutációk a mutációtól függően „malignus” és „benignus” formában is megnyilvánulhatnak. A gén Arg403Glu mutációja pl. magas penetranciával, a hirtelen szívhalál (SCD) fokozott gyakorisá-

gával, s kifejezett septumhypertrophiával jár (13) (14). Hasonló, „malignus” lefolyást mutatnak a MYH7 gén Arg719Trp (15), valamint az Arg453Cys mutációi is (13). A „malignus” MYH7 mutációkkal szemben pl. a Leu908Val mutációt alacsony penetrancia, benignus kórlefordulás s az SCD ritka előfordulása jellemzi (16).

A 719-es kodon által kódolt arginin a béta myozin nehéz lánc protein azon doménjének része, mely a myozin könnyű láncokkal áll interakcióban (17). A béta myozin nehéz lánc 719-es pozíciójában lévő arginin aminosav az összes felnőtt emlős myozin nehéz lánc szekvenciában megtartott, mely az adott aminosav esszenciális szerepét (strukturális vagy funkcionális) valószínűsíti. A 719-es kodonnál egy másik mutációt is leírtak már [Arg719Trp (15) (18)] több, egymással nem rokon családokban, mely az adott kodon az átlagosnál magasabb mutációs rátájára utalhat.

Az általunk leírt Arg719Gln mutációt egy amerikai munkacsoport is észlelte már korábban (19). Ők egy hispán eredetű, három generációs családfát közöltek, melyben négy mutációhordozót találtak. Az egyetlen érintett gyermekben 16 mm-nek találták a septumvastagságot, míg a másik három mutációhordozó felnőttben a septum vastagsága 20-27 mm volt. A családban benignus lefolyást mutatott a betegség, a négy érintett családtag egyikének sem volt syncopéja vagy presyncopéja, EKG-juk normális volt, terheléses vizsgálatukkor és Holter monitorizálásuk során sem észleltek kórosat. A betegség a felnőtt kort elértékben 3 éves korukig kialakult. A család 64 hozzátartozójának kórtörténetében nem találtak hirtelen szívhalálra utaló történetet. Mindezekkel szemben az általunk észlelt családban a mutációhordozó anyja fiatal korban bekövetkezett hirtelen szívhalála és az érintett kisfiú súlyos morfológiai és EKG eltérésekkel járó HCM-e malignus megjelenésű betegségre utal. A 719-es kodonnál leírt másik mutáció,



Arg719Trp, melyet négy, egymással nem rokon családban is kimutattak, esetünkhöz hasonlóan malignus megjelenést mutatott (15). Az azonos mutáció két eltérő formában való megjelenésének oka ismeretlen, bár más HCM mutációk esetében is észlelték már (13) (20). Elképzelhető, hogy a két különböző genetikai háttér szerepel a mutáció eltérő expressziójának okaként, modifikátor géneken keresztül. Azt sem lehet kizárni, hogy esetünkben a malignus megjelenés hátterében egy második, esetleg egy másik gént érintő második mutáció játszik szerepet az eltérő klinikai megjelenés okaként.

### Köszönetnyilvánítás

Jelen publikáció a magyar–olasz és magyar–görög kormányközi tudományos és technológiai együttműködés keretében (I 29/98 és GR 42/99), az OMFB és külföldi szerződéses partnerei, a Ministero degli Affari Esteri Direzione Generale delle Relazioni Culturali, VII (Olaszország) és a Ministry of Development, GSRT (Görögország), valamint az F 029702 sz. OTKA (Dr. Sepp Róbert) és 46/2000 sz. ETT (Prof. Dr. Csanády Miklós) támogatásával jött létre.

### IRODALOM

1. Richardson P., McKenna W., Bristow M. és mtsai: Report of the 1995 World Health Organization/International Task Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93: 841–2.
2. Maron BJ., Gardin JM., Flack JM. és mtsai: Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in general population of young adults: echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. *Circulation* 1995; 92: 785–9.
3. Geisterfer-Lowrance AAT., Kass S., Tanigawa G. és mtsai: A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a b cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell* 1990; 62: 999–1006.
4. Thierfelder L., Watkins H., MacRae C. és mtsai: Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* 1994; 77: 701–12.
5. Watkins H., Conner D., Thierfelder L. és mtsai: Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 1996; 11: 434–7.
6. Bonne G., Carrier L., Bercovici J. és mtsai: Cardiac myosin binding protein-C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 1996; 11: 438–40.
7. Poetter K., Jiang H., Hassanzadeh S. és mtsai: Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. *Nat Genet* 1996; 13: 63–9.
8. Kimura A., Harada H., Park J-E. és mtsai: Mutations in the troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Gen* 1997; 16: 379–82.
9. Mogensen J., Klausen I., Pedersen A. és mtsai: Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1999; 103: R39–R43.
10. Satoh M., Takahashi M., Sakamoto T. és mtsai: Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262: 411–7.
11. Bonne G., Carrier L., Richard P. és mtsai: Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects. *Circ Res* 1998; 83: 580–93.
12. Sepp R., Csanády M.: A hypertrophias cardiomyopathia klinikai és molekuláris genetikája. (Clinical and molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy.) *Orv Hetil* 1998; 139: 1965–71.
13. Watkins H., Rosenzweig A., Hwang DS. és mtsai: Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy [see comments]. *N Engl J Med* 1992; 326: 1108–14.
14. Marian AJ.: Sudden cardiac death in patients with hypertrophic cardiomyopathy: from bench to bedside with an emphasis on genetic markers. *Clin Cardiol* 1995; 18: 189–98.
15. Anan R., Greve G., Thierfelder L. és mtsai: Prognostic implications of novel beta cardiac myosin heavy chain gene mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy [see comments]. *J Clin Invest* 1994; 93: 280–5.
16. Epstein ND., Cohn GM., Cyran F. és mtsai: Differences in clinical expression of hypertrophic cardiomyopathy associated with two distinct mutations in the beta-myosin heavy chain gene. A 908Leu-Val mutation and a 403Arg-Gln mutation [see comments]. *Circulation* 1992; 86: 345–52.
17. Rayment I., Holden H., Sellers J. és mtsai: Structural interpretation of the mutations in the beta-cardiac myosin that have been implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3864–8.
18. Jeschke B., Uhl K., Schroder D. és mtsai: A high risk phenotype of hypertrophic cardiomyopathy associated with a compound genotype of two mutated beta-myosin heavy chain genes. *Hum Genet* 1998; 102: 299–304.
19. Consequence MW., Salada GC., Baylen BG. és mtsai: A new missense mutation, Arg719Gln, in the beta-cardiac heavy chain myosin gene of patients with familial hypertrophic cardiomyopathy [published erratum appears in *Hum Mol Genet* 1994 Sep; 3(9):1716]. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1025–6.
20. Fananapazir L., Epstein ND.: Genotype-phenotype correlations in hypertrophic cardiomyopathy. Insights provided by comparisons of kindreds with distinct and identical beta-myosin heavy chain gene mutations [see comments]. *Circulation* 1994; 89: 22–32.

**VI.**



# A MIOZINKÖTŐ C FEHÉRJE GÉN ÚJ MUTÁCIÓJÁNAK AZONOSÍTÁSA MAGYAR HYPERTROPHIÁS CARDIOMYOPATHIÁS CSALÁDBAN

Dr. Sepp Róbert,<sup>(1)</sup> Dr. Jebelovszki Éva,<sup>(1)</sup> Dr. Borthaiser Angéla,<sup>(1)</sup> Dr. Dongó Ágnes,<sup>(1)</sup>  
Alessandra Rampazzo PhD,<sup>(2)</sup> Dr. Pálinkás Attila,<sup>(1)</sup> Dr. Forster Tamás,<sup>(1)</sup> Dr. Aris Anastasakis,<sup>(3)</sup>  
Gian Antonio Danieli BSc,<sup>(2)</sup> Dr. Csanády Miklós<sup>(1)</sup>

(1) Szegedi Tudományegyetem ÁOK, Szent-Györgyi A. Orvos és Gyógyszerésztudományi Centrum,  
II. Belgyógyászati Klinika és Kardiológiai Központ

(2) Department of Biology, University of Padova, Italy

(3) Department of Inherited Cardiac Diseases and Sports Medicine, University of Athens, Greece

**ÖSSZEFOGLALÁS:** A hypertrophias cardiomyopathia jelen ismereteink szerint a szívizom szarkomerjének betegsége, melyet a szarkomer kontraktilis apparátusát felépítő fehérjéket kódoló gének mutációja okoz. Mindeddig kilenc különböző gén mutációját sikerült kimutatni hypertrophias cardiomyopathias betegekben, melyek közül a miozinkötő C fehérje gén mutációi az egyik leggyakoribbak. Munkánkban egy hypertrophias cardiomyopathiában szenvedő beteg és családjának mutációanalízisét végeztük el. Az érintett egyén betegsége aszimmetrikus septum-hypertrophia képében nyilvánult meg (septum: 32 mm, hátsó fal: 9 mm), kiáramlási obstrukció nélkül. Béta-blokkoló kezelés mellett gyakorlatilag panaszmentes volt, hatéves utánkövetése alatt syncopéja, malignus kamrai ritmuszavara nem jelentkezett. Negyvenkilenc éves korában halt meg, pulmonalis és agyi thromboembolisatio következtében. Molekuláris genetikai vizsgálatokkal a miozinkötő C fehérje gén 33-as exonja 1226-os kodonjának CAG-TAG mutációját találtuk, mely aminosavszinten a normálisan meglévő glutamin stop kodonra való változásával jár (Gln1226Stop). A mutáció következtében feltehetőleg deletálódik a fehérje terminális 48 aminosavja, ami – mivel a fehérje e része normális esetben a miozinmolekulához való kötődésért felelős – patognomikus jelentőséggel bír. Családszűrés során két gyermeke mutációhordozó státusza igazolódott, mindkét gyermek panasz- és tünetmentes, EKG-juk és echokardiogramjuk normális. Az általunk észlelt mutáció világszerte is új, valamint esetünk az első igazolt miozinkötő C fehérje gén mutáció magyar hypertrophias cardiomyopathias betegen.

Sepp R, Jebelovszki É, Borthaiser A, Dongó Á, Rampazzo A, Pálinkás A, Forster T, Anastasakis A, Danieli GA, Csanády M: IDENTIFICATION OF A NOVEL MYOSIN BINDING PROTEIN C GENE MUTATION IN A HUNGARIAN FAMILY WITH HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY

**SUMMARY:** Hypertrophic cardiomyopathy is the disease of the cardiac sarcomer, as it is caused by mutations in genes encoding the contractile apparatus of the sarcomer. To date, mutations have been identified in nine different genes in patients with hypertrophic cardiomyopathy; the myosin binding protein C gene being one of the most prevalent among them. In this work we performed a mutation analysis of a patient with hypertrophic cardiomyopathy. The proband's disease was characterised by asymmetric septum hypertrophy (septum: 32 mm, posterior wall: 9 mm), without intraventricular obstruction. During 6 years follow up she remained asymptomatic on beta blocker therapy; she was free of syncopal episodes and major ventricular arrhythmias. She died at age 49 because of pulmonary and cerebral thromboembolism. With molecular genetic analysis we identified a C to T transversion at codon 1226 in exon 33 of the myosin binding protein C gene which causes the introduction of a stop codon instead of glutamine (Gln1226Stop). The consequence of the mutation presumably is the loss of the terminal 48 amino acid at the site of the protein which is responsible for binding to myosin. On family screening we found two of the patient's children to be genetically affected. Neither of them have signs or symptoms of hypertrophic cardiomyopathy, and both have a normal ECG and echocardiogram. The identified Gln1226Stop mutation is a novel hypertrophic cardiomyopathy mutation and the first myosin binding protein C gene mutation identified in a Hungarian patient with hypertrophic cardiomyopathy so far.

Magy Belorv Arch. 2001; 54. 170–176.

A hypertrophiás cardiomyopathia (HCM) típusos esetben a kamrák közti septum aszimmetrikus hypertrophiája formájában megnyilvánuló primer szívizombetegség.<sup>9</sup> Legfrissebb adatok szerint a HCM jóval gyakoribb, mint korábban gondolták, prevalenciája kb. 1:500–1:1000.<sup>5</sup> Klinikailag a betegek tünet- és panaszmentesek lehetnek, de gyakoribb a panaszok jelentkezése angina, effort dyspnoe, palpitatio vagy syncope formájában. Gyakori a különböző ritmuszavarok fellépte és fokozott a hirtelen szívhalál kockázata is.

Az elmúlt 10 év molekuláris genetikai kutatásai azt igazolták, hogy a HCM-et a szarkomer felépítésében részt vevő fehérjéket kódoló gének mutációi okozzák. Jelenlegi adatok szerint 9 gén, a béta-miozin nehéz lánc (14q11),<sup>3</sup> alfa-tropomiozin (15q22),<sup>12</sup> troponin T (1q3),<sup>12</sup> miozinkötő C fehérje (11p11.2),<sup>1,13</sup> esszenciális (3p21.31) és regulatorikus miozin könnyű lánc (12q24.21),<sup>8</sup> troponin I (19p11),<sup>4</sup> szívizomspecifikus alfa-aktin (15q12)<sup>6</sup> és titin (2q31-32)<sup>10</sup> gének mutációi vezethetnek HCM-hez. Mivel a fenti fehérjék a szarkomer kontrakció-relaxáció folyamatában közvetlenül vagy közvetetten részt vesznek, ezért a HCM-et jelen tudásunk szerint a szarkomer betegségének tekinthetjük.

A HCM-et okozó gének közül a béta-miozin nehéz lánc gén (MYH7) és a miozinkötő C fehérje gén (MYBPC3) mutációi a leggyakoribbak, melyek külön-külön a HCM-es esetek mintegy 30–35%-át okozzák. Munkacsoportunk az első magyar HCM-es betegben észlelt mutációt a béta-miozin nehéz lánc génben azonosította (Arg719Gln),<sup>11</sup> mely korai expresszióval, magas penetranciával, malignus klinikai képpel járt.

A HCM-et okozó gének közül a miozinkötő C fehérje gén (MYBPC3) a másik leggyakrabban érintett gén.<sup>2</sup> A génben észlelt mutációk nagyobb része, a többi HCM génnel ellentétben, az mRNS splicing-ját módosító ún. „splice site” mutáció, amely következményeként csonkolt, a normális proteinnél rövidebb fehérjék íródnak át. A csonkolás általában a fehérje C-terminális részét érinti, ahol a fehérje működése szempontjából esszenciális miozin- és titinkötő domén helyezkedik el. A MYBPC3 génmutációk által létrehozott HCM fenotípust korszpecifikus penetrancia, enyhe balkamra-hypertrophia és benignus kórlefolyás jellemzi.

Munkánkban egy 49 éves korában HCM-ben meghalt beteg mutációanalízisét végeztük el. A mutációanalízis a miozinkötő C fehérje gén Gln1226Stop mutációját igazolta a gén 33-as exonjában. A beteg családjának vizsgálata azt mutatta, hogy a mutációt két, klinikailag nem érintett gyermeke is örökölte. A mutáció az első magyar betegben igazolt HCM-et okozó MYBPC3 génmutáció.

## Anyag és módszer

### Klinikai vizsgálatok

A beteg és a hozzátartozók vizsgálatakor előzetes beleegyezés után minden esetben részletes anamnézist vettünk fel, áttanulmányoztuk az

esetlegesen rendelkezésre álló orvosi dokumentációt, fizikális vizsgálatot, 12 elvezetési EKG-t és transthoracalis echokardiográfiát végeztünk.

### Genetikai analízis

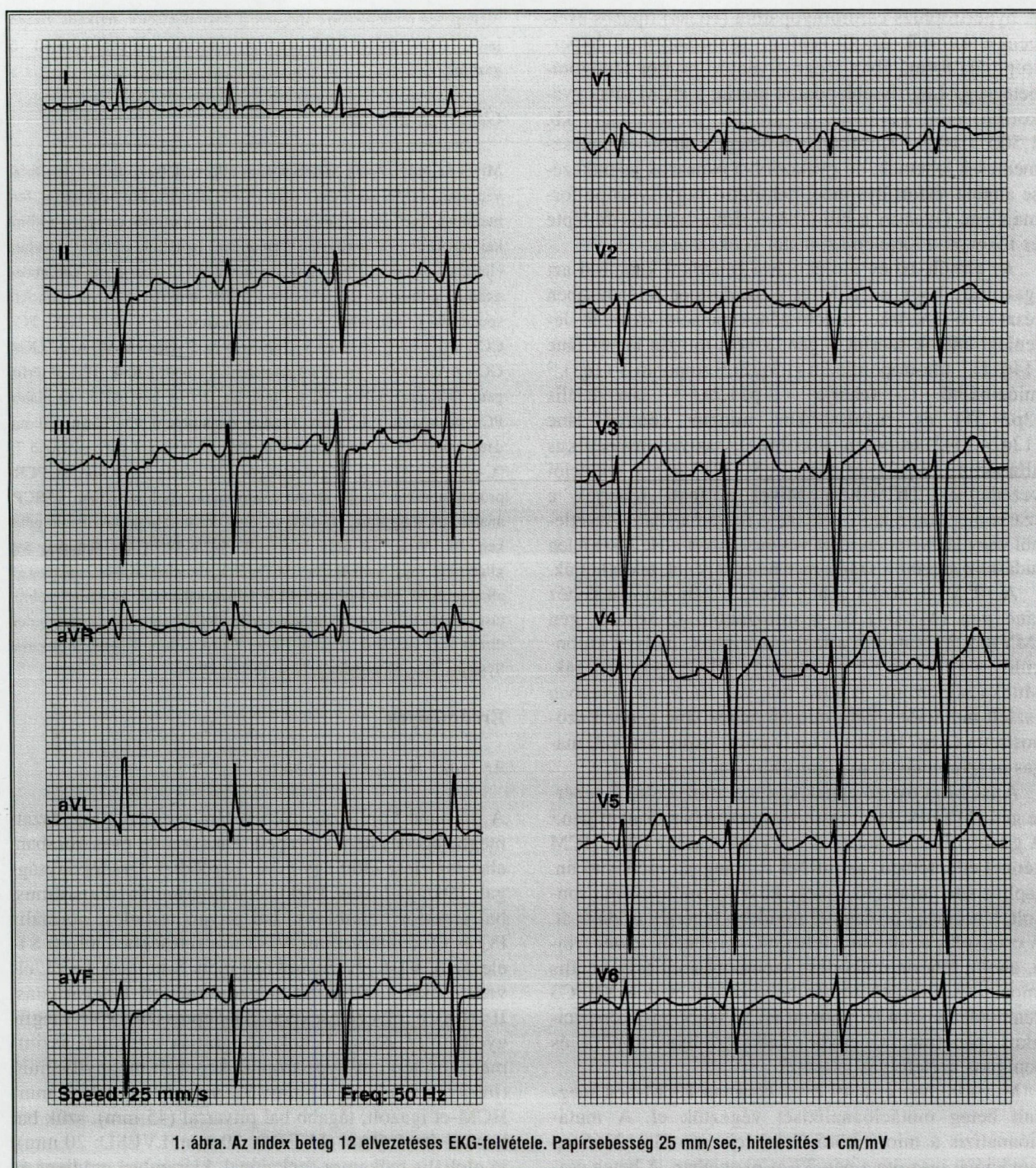
Mivel az index beteg esetében nem állt rendelkezésünkre perifériás vérminta, a DNS izolálása a sectio során rutinszerűen beágyazott, formalinban fixált szövetekből történt. A hozzátartozók esetében a klinikai viziteken vett perifériás vérmintából izoláltuk a DNS-t standard eljárással. A minta-DNS-ekből a miozinkötő C fehérje gén különböző exonjait polimeráz láncreakcióval (PCR) amplifikáltuk, az exonokra specifikus primerekkel. A gén 33-as exonját az 5'-GAT GTG TCT CCC TGG GTC CCT G-3' (forward) és 5'-GAG GAC AAC GGA GCA AAG CCC-3' (reverse) primerekkel amplifikáltuk, 12,5 µl térfogatú PCR-reakcióban, 50 ng templát DNS-t használva, az alábbi PCR-protokollal: 1,5 perc kezdeti denaturáció 95 °C-on; 30 mp denaturáció 94 °C-on, 30 mp annealing 55 °C-on, 1 perc extenzió 72 °C-on, 35 ciklussal, végső elongáció 5 percig 72 °C-on. A PCR-termékeket 'single strand conformation polymorphism' (SSCP) analízissel vizsgáltuk, 10–15%-os, nem denaturáló poliakrilamid géleken 200 V-on, 18 órán keresztül, 5–25–37 °C-on futtatva, 5% glicerollal vagy anélkül. Az SSCP-gélek vizualizálásához ezüsfestést alkalmaztunk, standard metodikák felhasználásával. Az eltérő mobilitást mutató PCR-termékeket ABI PRISM automata szekvenálón direkt szekvenáltuk (Perkin-Elmer Corporation, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, New Jersey, USA).

### Eredmények

#### Az index beteg kórtörténete

A proband kórelőzményében lényeges belgyógyászati megbetegedés nem szerepelt. Panaszai 43 éves korában, első észlelése előtt egy évvel kezdődtek fáradékonysággal, lábdagadással. Elektrokardiogramján sinusritmus, bal anterior hemiblokk, bal pitvari terhelés, normális PQ és QTc intervallum, V1-3 elvezetésekben jelzett ST-eleváció, V1-6 elvezetésekben mély S-hullám, I-aVL elvezetésekben jelzett ST-eleváció mellett T-negativitás, II-III-aVF elvezetésekben ST-depresszió volt megfigyelhető (1. ábra). Echokardiográfiás vizsgálata aszimmetrikus septum-hypertrophia képében megnyilvánuló (intraventricularis septum: 32 mm, hátsó fal: 9 mm) HCM-et igazolt, tágabb bal pitvarral (45 mm), szűk bal kamrai átmérőkkel (LVEDD: 39 mm, LVESD: 20 mm), jó globális balkamra-funkcióval, kiáramlási gradiens és systolic anterior motion (SAM) jelenség nélkül, jelzett mitralis insufficienciával. Kezdetben béta-blokkoló, majd retard verapamil-terápia mellett rendszeres ambuláns megjelenéseikor időnkénti palpitatioérzés mellett panaszai progressziót nem mutattak. Sinusritmusban volt, mellkasi fájdalom, fulladás, eszméletvesztés követése alatt nem jelentkezett. Echoparamétereiben az évek során a septumvastagság csökkenését, a bal pitvari és a bal kamrai átmérők enyhe növekedését lehetett észlelni, de bal kamrai dilatatio nem alakult ki. Negyvenkilenc éves korában, hatéves utánkövetés után otthonában hir-



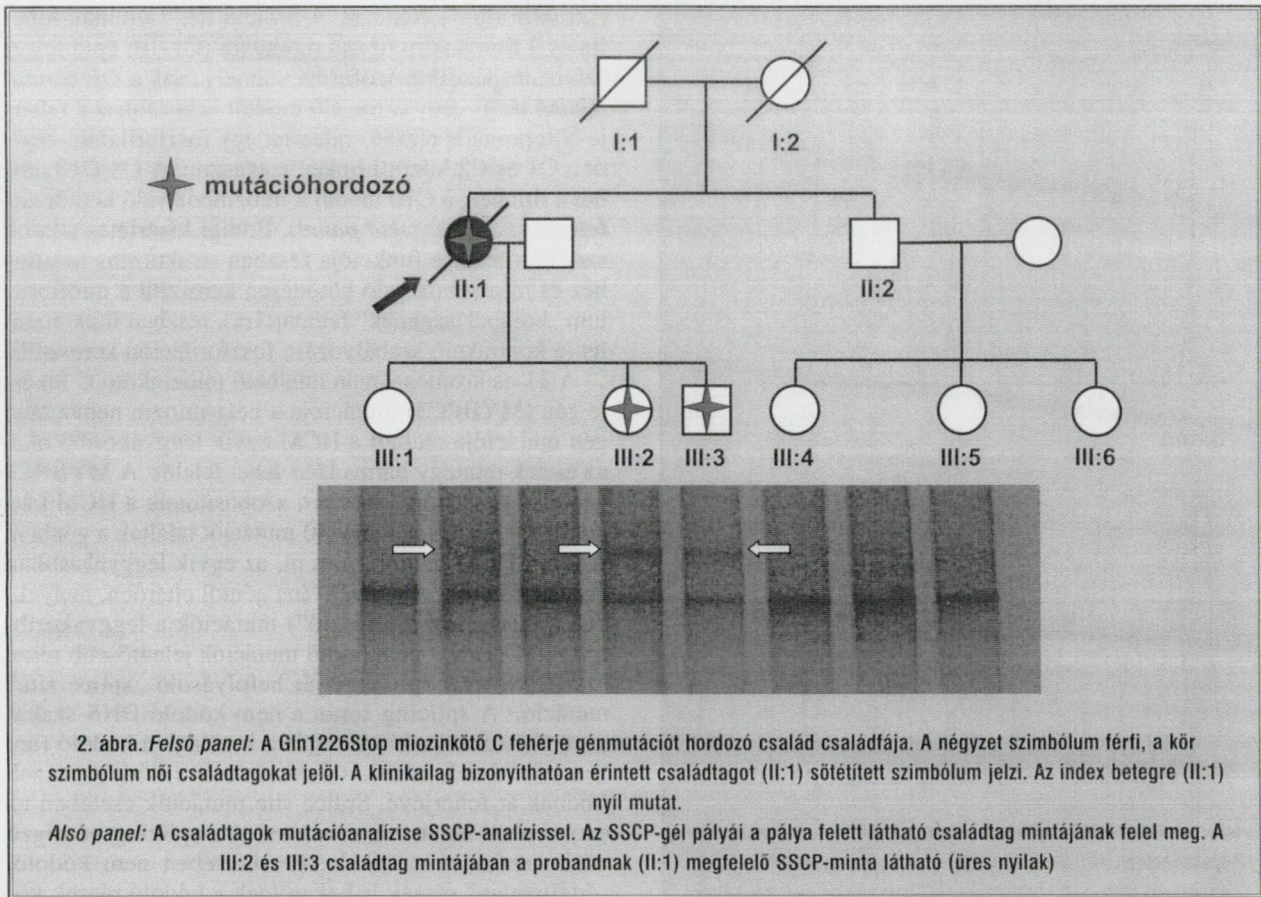


telen eszméletét vesztette, s négynapos intézeti észlelés után meghalt. Boncolásakor hypertrophizált, 490 g súlyú szívet találtak, régi myocardium-hegesedéssel, melyhez bal kamrai thrombosis társult. A bal kamrai thrombosis embolisációhoz vezetett a nyúltvelőben, a jobb vesében és a májban. Hasonlóképpen thromboembolisatio volt észlelhető a bal tüdőfélben, melynek forrása a kismedencei vénás plexus phlebothrombosisa volt. Szövetteni vizsgálattal a szívizomkimetszésekben HCM-re jellemző „myofiber disarray”-t, valamint

myocyta-hypertrophiát, kiterjedt fibrosist és kísér-betegséget lehetett észlelni.

Családi anamnézise szerint édesanyja (I:2, családja a 2. ábrán, felső panel) 55 éves korában exitált collumcarcinoma miatt, édesapja (I:1) 66 éves korában halt meg, közelebbről nem ismert „szívbetegség” következtében. Családtagjai közül három gyermekét (III:1, III:2, III:3), bátyját (II:2) és két unokahúgát (III:4, III:5) volt módunkban megvizsgálni. Mindannyian panasz- és tünetmentesek voltak időszakos palpítőérzéstől elte-





kintve. Eszközös vizsgálatuk (12 elvezetéses EKG és echokardiográfia) HCM-re diagnosztikus eltérést nem mutatott.

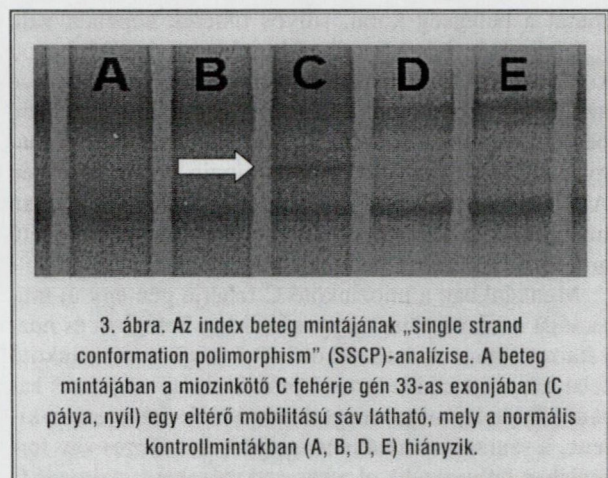
#### Genetikai vizsgálatok

A beteg mintájának SSCP-vizsgálatakor egy eltérő mobilitású sávot észleltünk a miozinkötő C fehérje gén (MYBPC3) 33-as exonjában (3. ábra). A PCR-produktum szekvenálása a gén 19489-es pozíciójában egy citozin-timin (C-T) tranzíciót mutatott (4. ábra). A mutációt az ellenirányú szál szekvenálásakor is igazolni lehetett. A mutáció a gén 1226-os kodonját érintette, s az itt lévő glutamint kódoló (CAG) kodont STOP kodonra (TAG) változtatta (Gln1226Stop). A szekvenációanalízis alapján a beteg heterozigóta volt a mutáció jelenlétére, egy normális és egy mutáns allélt hordozva. Hasonló báziscserét nem találtunk további száz, nem rokon kromoszóma vizsgálatokor.

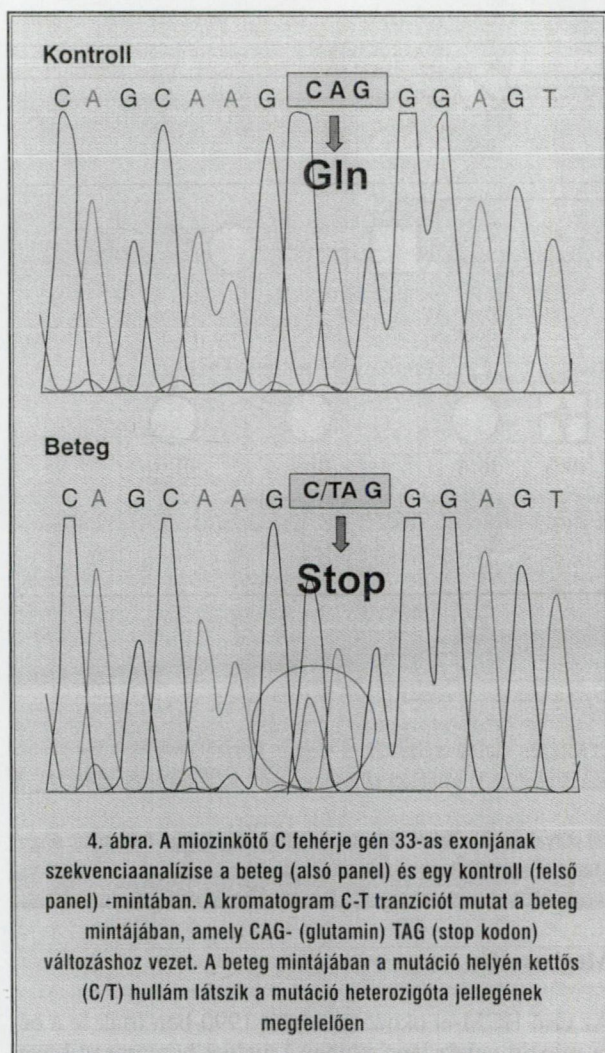
A családtagok genetikai analízisekor azt találtuk, hogy az index beteg mellett két gyermeke (III:2, III:3) hordozza a mutációt, a további családtagok genetikailag nem érintettek (2. ábra, alsó panel). Mindkét mutációhordozó gyermek panasz- és tünetmentes, EKG-juk normális, echokardiogramjukon mitralis prolapsus látható.

#### Megbeszélés

Az első HCM-et okozó mutációt 1990-ben írták le a béta-miozin nehéz lánc génben,<sup>3</sup> melyet hamarosan követte a többi HCM-et okozó géntérítés azonosítása. Rövidesen kiderült, hogy a hypertrophiás cardiomyopathiát genetikai szempontból nagyfokú lókus- és allélheterogenitás jellemzi: HCM-et kilenc különböző génben bekövetkezett mutáció is létrehozhat, ezen túl egy génen belül többféle mutáció is kialakulhat. Adatok utalnak







arra is, hogy egyes esetekben az adott mutáció szoros kapcsolatot mutat a mutáció következtében létrejövő klinikai képpel, pl. egyes mutációk „benignus” klinikai vonásokkal járnak, enyhe tünetekkel és nem kifejezett balkamra-hypertrophiával, kedvező életkilátásokkal. Más esetekben a mutáció „malignus” klinikai vonásokat mutat a betegség korai, súlyos tünetek képében való megjelenésével és a fiatalkori hirtelen szívhalál fokozott kockázatával. Ugyanazon mutáció klinikai megjelenése azonban változó lehet különböző geográfiai régióban, például a munkacsoportunk által azonosított első magyar HCM-es mutáció, a béta-miozin nehéz lánc gén Arg719Gln mutációja az általunk észlelt családban malignus klinikai képpel járt,<sup>11</sup> míg egy hispán eredetű amerikai famíliában benignus megjelenést mutatott.

Munkánkban a miozinkötő C fehérje gén egy új mutációját azonosítottuk magyar HCM-es betegben és hozzátartozóiban. A miozinkötő C fehérje a miozinkötő fehérjék csoportjába tartozó protein, mely az összes harántcsíktal izomban megtalálható.<sup>14</sup> A fehérje hét-kilenc, a szarkomer axiális tengelyére merőleges sáv formájában helyezkedik el a keresztköteket tartalmazó C

(„crossbridge”) zónában. A protein tíz, 7 immunglobulin és 3 fibronektin típusú modulból (C1-10) épül fel. A szívizomspecifikus izoforma – amely csak a szívben található meg – egy extra, C0 modul is tartalmaz a fehérje N-terminális részén, valamint egy foszforilálható régiót a C1 és C2 közötti linker szakaszon. A C8-C10 modul a titinhez, a C10 modul a miozinhoz való kötődésért felelős (5. ábra, felső panel). Eddigi kísérletes adatok szerint a fehérje funkciója részben strukturális (a titinhez és miozinhoz való kötődésen keresztül a miofibrillum „kompaktságának” fenntartása), részben funkcionális (a kontrakció szabályozása foszforiláción keresztül).

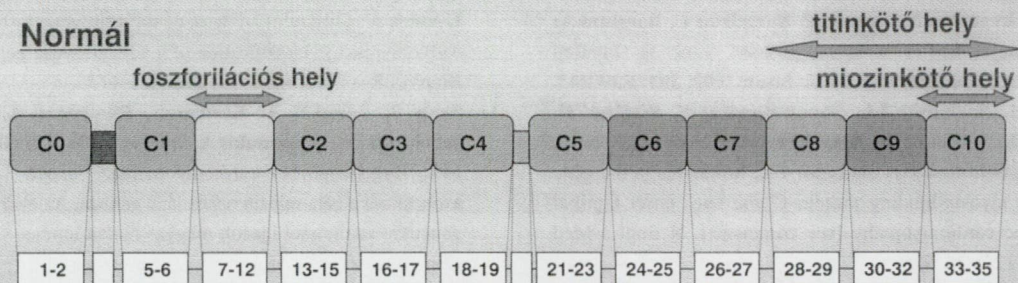
A 11-es kromoszómán található miozinkötő C fehérje gén (MYBPC3) mutációja a béta-miozin nehéz lánc gén mutációja mellett a HCM egyik leggyakoribb oka, az esetek mintegy harmadáért lehet felelős. A MYBPC3 gén első mutációit 1996-ban azonosították a HCM hátterében,<sup>1,13</sup> azóta mintegy 30 mutációt találtak a génben. A többi HCM géntől, mint pl. az egyik leggyakrabban érintett béta-miozin nehéz lánc géntől eltérően, melyekben a misszensz („tévesztő”) mutációk a leggyakoribbak, a MYBPC3 gént érintő mutációk jelentősebb része az mRNS ún. „splicing”-ját befolyásoló „splice site” mutáció.<sup>2</sup> A splicing során a nem kódoló DNS-szakaszok (ún. „intronok”) kivágásra kerülnek a kódoló (ún. „exon”) részek közül, s ezáltal csak a kódoló részek íródnak át fehérjévé. Splice site mutációk esetében az exon-intron határ felismerhetetlen a splicing-ot végző enzim számára, s ennek következtében nem kódoló, „értelmetlen” részek is bekerülnek a kódoló részek közé. Az esetek többségében az így képződött fehérjék az értelmetlen részek beépülésén túl csonkoltak is, mert a téves átírás során véletlenszerű stop kodonok is átíródnak, ahol a fehérjelánc transzlálódása leáll. A MYBPC3 gén esetében a csonkolt rész gyakorlatilag minden esetben érinti a fehérje C10 doménjét, mely a protein miozinhoz és titinhez való kötődéséért felelős.

Az általunk azonosított Gln1226Stop mutáció következménye egy aminosavat kódoló kodon stop kodonná való változása. Ennek következtében a fehérjelánc transzlálódása ezen a ponton leáll, s a 33-as exon további része, a 34-es és 35-ös exonok nem íródnak át, s a fehérje C-terminális 48 aminosavja hiányozni fog (5. ábra, alsó panel). Mivel az 1226-os kodon a gén C10 motíffját kódoló domén része, a protein miozin- és titinkötő funkciójáért felelős része eltűnik. Ennek direkt bizonyítékát a szívizomzatból preparált mRNS analízise adhatná, de mivel natív szívizomszövet nem állt rendelkezésünkre, ezt közvetlenül igazolni nem lehetett. Az általunk azonosított mutáció világszerte is egyedi, még senki nem észlelte, valamint magyar HCM-es betegben is az elsőként leírt MYBPC3 mutáció.

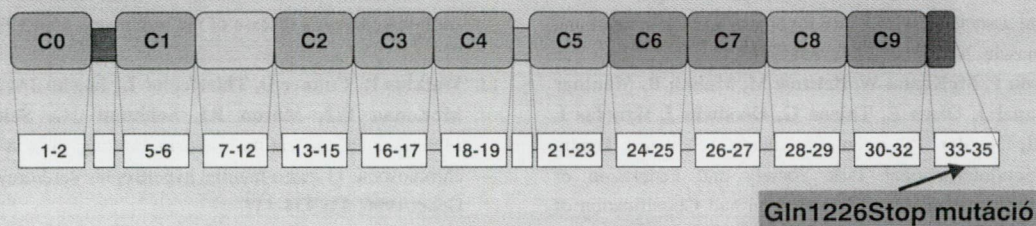
A mutációt az index betegen kívül két, jelenleg 34 és 18 éves gyermeke is örökölte. Mindkét gyermek panasz és tünetmentes, EKG-juk normális. Echokardiogramjukon a bal kamrai falvastagság normális, HCM-re utaló egyéb kóros eltérés sem volt igazolható. Az egyetlen észlelt eltérés mindkettejük esetében a mitralis bil-



## Normál



## Mutáns



5. ábra. Felső panel: a normál szívizomspecifikus miozinkötő C fehérje gén és protein szerkezete. A fehérje C0-C10 doménekből épül fel. A C1-C2 közötti linker rész a fehérje foszforilációjáért, a C8-C10 modul a titinhez, ill. a miozinhoz való kötődésért felelős. A fehérje moduláris szerkezete alatt az azt kódoló DNS sematikus szerkezete látható, az egyes boxokban az adott modult kódoló exonok számozásával.

Alsó panel: a Gln1226Stop mutáció következtében kialakuló protein hipotetikus szerkezete. A 33-as exonban bekövetkező mutáció következtében a C10 modul disztális 48 aminosavja hiányzik

lentyű prolapsusa volt, azonban mitralis prolapsust a második generáció összes, nem mutációhordozó tagjában is ki lehetett mutatni. A két gyermeket a fentiek alapján tünetmentes („non-penetráns”) hordozónak lehet tekinteni. Irodalmi adatok szerint gyakori jelenség, hogy fiatalok MYBPC3 mutációhordozók hosszú ideig tünetmentesek lehetnek, s 50 éves kor alatt a mutációhordozók akár 40%-ában nem észlelhetők a HCM klinikai jelei.<sup>7</sup> Később, a kor előrehaladtával egyre fokozódik a betegség megjelenésének esélye (ún. kor-specifikus, korral növekvő penetrancia). Ezen betegek, így esetünk két mutációhordozó tagjának is, szoros klinikai követése indokolt.

Összefoglalva, a miozinkötő C fehérje gén Gln1226Stop mutációját találtuk hypertrophiás cardiomyopathiás betegünkben. A klinikai fenotípust jelentős (>30 mm) septum-hypertrophia és korán bekövetkezett halál jellemezte. A mutációt két, klinikailag jelenleg nem érintett gyermeke is örökölte. Az azonosított mutáció az első, magyar betegben kimutatott MYBPC3 génmutáció, hasonlóképpen világszerte is egyedi.

## Köszönetnyilvánítás

A publikáció a magyar-olasz és magyar-görög kormányközi tudományos és technológiai együttműködés keretében (I 29/98 és GR 42/99), az OMFB és külföldi szerződéses partnerei, a Ministero degli Affari Esteri Direzione Generale delle Relazioni Culturali, VII és a Ministry of Development, GSRT, valamint az ETT 46/2000 (Prof. Dr. Csanádi Miklós) támogatásával jött létre. A szerzők megköszönik Dr. Csanádi

Jolán segítségét a kórboncolási lelet értékelésében és az autopsziás anyag rendelkezésre bocsátásában.

## IRODALOM

1. Bonne G, Carrier L, Bercovici J, Cruaud C, Richard P, Hainque B, Gautel M, Labeit S, James M, Beckmann J: Cardiac myosin binding protein-C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 1996; **11**: 438-440.
2. Bonne G, Carrier L, Richard P, Hainque B, Schwartz K: Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects. *Circ Res* 1998; **83**: 580-593.
3. Geisterfer-Lowrance AAT, Kass S, Tanigawa G, Vosberg H-P, McKenna WJ, Seidman CE, Seidman JG: A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a b cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell* 1990; **62**: 999-1006.
4. Kimura A, Harada H, Park J-E, Nishi H, Satoh M, Takahashi M, Hiroi S, Sasaoka T, Ohbuchi N, Nakamura T, Koyanagi T, Hwang T-H, Choo J-A, Chung K-S, Hasegawa A, Nagai R, Okazaki O, Nakamura H, Matsuzaki M, Sakamoto T, Toshima H, Koga Y, Imaizumi T, Sasazuki T: Mutations in the troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Gen* 1997; **16**: 379-382.
5. Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE: Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in general population of young adults: echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. *Circulation* 1995; **92**: 785-789.



6. Mogensen J, Klausen I, Pedersen A, Egeblad H, Bross P, Kruse T, Gregersen N, Hansen P, Baandrup U, Borglum A: Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1999; **103**: R39-R43.
7. Niimura H, Bachinski LL, Sangwatanaroj S, Watkins H, Chudley AE, McKenna W, Kristinsson A, Roberts R, Sole M, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE: Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy [see comments]. *N Engl J Med* 1998; **338**: 1248-1257.
8. Poetter K, Jiang H, Hassanzadeh S, Master SR, Chang A, Dalakas MC, Rayment I, Sellers JR, Fananapazir L, Epstein ND: Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. *Nat Genet* 1996; **13**: 63-69.
9. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarsas I, Martin I, Nordet P: Report of the 1995 World Health Organization/International Task Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation* 1996; **93**: 841-842.
10. Satoh M, Takahashi M, Sakamoto T, Hiroe M, Marumo F, Kimura A: Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **262**: 411-417.
11. Sepp R, Pálkás A, Kertész E, Rampazzo A, Dongó Á, Jebelovszki É, Anastasakis A, Forster T, Danieli GA, Csanády M: Hypertrophias cardiomyopathiát okozó génmutáció azonosítása a béta miozin nehéz lánc génben. Az első molekuláris genetikai analízissel igazolt magyar család leírása. *Cardiologica Hungarica* 2001; **1**: 65-70.
12. Thierfelder L, Watkins H, MacRae C, Lamas R, McKenna W, Vosberg HP, Seidman JG, Seidman CE: Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* 1994; **77**: 701-712.
13. Watkins H, Conner D, Thierfelder L, Jarcho JA, MacRae C, McKenna WJ, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE: Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 1996; **11**: 434-437.
14. Winegrad S: Cardiac myosin binding protein C. *Circ Res* 1999; **84**: 1117-1126.